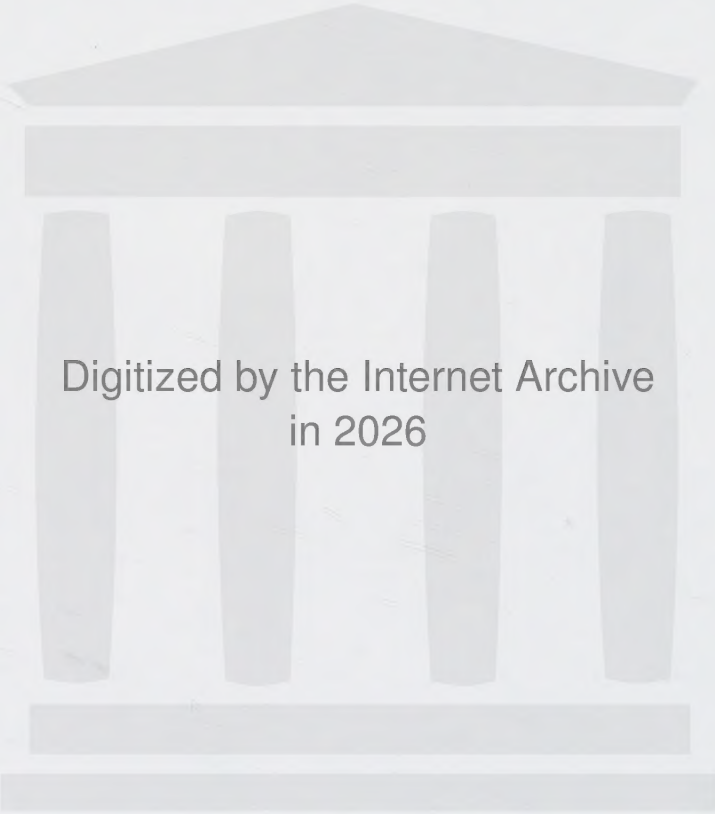


ÜBER DIE WIRKUNG
VON SUBCUTANEN NIKOTINGABEN
UND BERAUCHUNG
AUF ADRENOCORTICALE FUNKTIONEN
BEI RATTEN

Jochen Seifert

1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548325_0033

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München

Vorstände: Prof.Dr.med. K. Thureau

Prof.Dr.med. G. ten Bruggencate

Prof.Dr.med. E. Gerlach

ÜBER DIE WIRKUNG VON SUBCUTANEN NIKOTINGABEN
UND BERAUCHUNG AUF ADRENOCORTICALE FUNKTIONEN
BEI RATTEN



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Dr.-Ing. Jochen Seifert
aus

Schondorf

1981



Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.med. Klaus Thureau

Dekan: Prof.Dr.med. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.1981

Herrn Prof.Dr. K. Thureau, dem Vorstand des Physiologischen Instituts, schulde ich besonderen Dank für die Überlassung des Themas, die großzügige Förderung der vorliegenden Arbeit und die rege Diskussion.

Herr Prof.Dr. P. Vecsei vom Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg stellte freundlicherweise die Corticosteron- und Aldosteron-Antikörper zur Verfügung.

Bei Frau E. Schmidmeier bedanke ich mich für die hervorragende technische Assistenz.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	2
2.1 Aufnahme und Elimination des Nikotins	2
2.2 Wirkung des Nikotins auf den Blutdruck	3
2.3 Hormone der Nebennierenrinde	6
2.3.1 Physiologische Aspekte	6
2.3.2 Regulation der Glucocorticoid-Plasma- konzentration	9
2.3.3 Regulation der Aldosteron-Plasma- konzentration	11
2.4 Einflüsse von Nikotingaben bzw. Tabakrauch- inhalation auf die Glucocorticoide	12
2.4.1 Mensch	12
2.4.1.1 Tabakrauchinhalation	12
2.4.1.2 Direkte Nikotingaben	14
2.4.2 Tiere	14
2.4.2.1 Tabakrauchinhalation	14
2.4.2.2 Direkte Nikotingaben	14
2.4.3 In vitro	20
2.5 Einflüsse von Nikotingaben bzw. Tabakrauch- inhalation auf die Mineralcorticoide	21
3. PROBLEMSTELLUNG UND VERSUCHSPLAN	23
4. MATERIAL UND METHODEN	26
4.1 Versuchstiere	26
4.2 Berauchung	26
4.3 Nikotindosierung	29

	Seite
4.4	Dexamethasondosierung 30
4.5	Blutgewinnung 30
4.6	Bestimmung der Hormonkonzentration im Plasma 31
4.6.1	Material
4.6.2	Ansatz 32
4.6.3	Extraktion 32
4.6.4	Chromatographie 33
4.6.4.1	Aufbau der Chromatographieanlage 33
4.6.4.2	Lokalisation und Bestimmung der Recovery 34
4.6.4.3	Bearbeitung der hormonhaltigen Fraktionen 36
4.6.5	Radioimmunoassay 36
4.6.5.1	Eichreihen 36
4.6.5.2	Teilung der Proben 37
4.6.5.3	Radioaktiv markierte Steroide 37
4.6.5.4	Antikörper 37
4.6.5.5	Dextran-Kohle-Suspension 38
4.6.5.6	Dekantieren 38
4.6.5.7	Auswertung des Radioimmunoassays 38
4.7	Statistische Auswertung 39
5.	ERGEBNISSE 41
5.1	Hormonbestimmung 41
5.1.1	Recovery 41
5.1.2	Empfindlichkeit 41
5.1.3	Spezifität 41
5.1.4	Präzision 42
5.1.5	Steroidkonzentrationen unter Normalbedingungen und nach Dexamethasongaben 42

	Seite
5.1.6	Bindungskapazität 43
5.1.7	Eichkurve 43
5.2	Versuche mit normaler ACTH-Sekretion 43
5.2.1	Berauchungsversuche 43
5.2.1.1	Kurzversuch über 30 Stunden mit Berauchung 43
5.2.1.2	Mehrwöchige Versuche mit Berauchung 46
5.2.2	Mehrwöchige Versuche mit s.c. Nikotingaben 46
5.2.2.1	Nikotin gelöst in physiologischer Kochsalzlösung 47
5.2.2.2	Nikotin gelöst in Olivenöl 50
5.3	Versuche mit ACTH-Suppression durch Dexamethason 50
5.3.1	Mehrwöchige Versuche mit Berauchung 51
5.3.2	Mehrwöchige Versuche mit s.c. Nikotingaben 52
5.3.2.1	Nikotin gelöst in physiologischer Kochsalzlösung 52
5.3.2.2	Nikotin gelöst in Olivenöl 54
6.	DISKUSSION 55
6.1	Normalwerte 55
6.2	Kurzzeitversuch 55
6.3	Langzeitversuche mit normaler ACTH-Sekretion 56
6.4	Langzeitversuche mit ACTH-Suppression durch Dexamethason 58
6.5	Deutung der Verminderung der Aldosteron-Plasmakonzentration 59
7.	ZUSAMMENFASSUNG 62
8.	LITERATURANGABEN 65
9.	ANHANG 79

1. EINLEITUNG

Bereits seit einigen Jahren ist gesichert, daß gewohnheitsmäßiges Rauchen einen bedeutsamen Risikofaktor bei der Pathogenese cardiovascularer Erkrankungen darstellt. Weitgehende Unklarheit herrscht aber auch heute noch über die Wirkungsmechanismen, durch die Rauchen das Herz-Kreislauf-System beeinflusst.

Bekanntlich können verschiedene Hormonsysteme im Zusammenhang mit der Entstehung cardiovascularer Krankheiten stehen. Eine zentrale Stellung nehmen hierbei die Hormone ein, die in der Nebenniere gebildet werden. So erzeugt z.B. eine Überproduktion der im Nebennierenmark erzeugten Catecholamine das typische Bild des Phäochromozytoms mit intermittierenden Blutdruckkrisen. Aber auch die Hormone, die in der Rinde der Nebenniere gebildet werden, können bei der Pathogenese cardiovascularer Krankheiten entscheidende Bedeutung erlangen, wie die vermehrte Freisetzung von Glucocorticoiden (z.B. Cushing-Syndrom) und von Mineralcorticoiden (z.B. Conn-Syndrom). Bei letzteren erfolgt die Wirkung auf das Herz-Kreislauf-System über eine Veränderung des Elektrolythaushaltes, vor allem des Natrium-Stoffwechsels.

Unter diesen Gesichtspunkten wird in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Inhalation von Zigarettenrauch und/oder subcutane Nikotingaben die Hormone der Nebennierenrinde im Tierversuch beeinflussen. Als Parameter dienten hierbei die Plasmakonzentrationen des Mineralcorticoids Aldosteron und des Corticosterons, das das mengenmäßig bedeutendste Glucocorticoid der Ratte darstellt.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Aufnahme und Elimination des Nikotins

Nikotin, ein Pyridinabkömmling, ist eine flüssige, mit Wasser destillierbare Base und stellt das pharmakologisch wirksame Alkaloid im Tabak dar (vgl. Abb. 1).

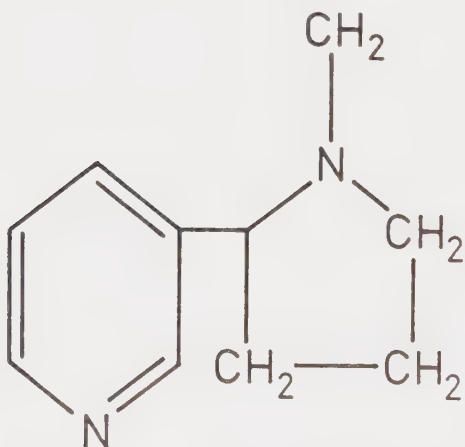


Abb. 1: Struktur des Nikotin-Moleküls (Molekulargewicht 162).

Der Nikotingehalt im Rauch einer Zigarette beträgt zwischen 0,4 und 3 mg. Bei Zigarren kann dieser Wert mehr als das Zehnfache betragen. Durch Inhalation des Rauches werden bis zu 90% des Nikotins resorbiert (Schievelbein, 1968).

Das in den Körper aufgenommene Nikotin wird zum größten Teil in der Leber metabolisiert (McKennis, 1965; Schievelbein, 1968). Dies ist schon seit den klassischen Versuchen von Lautenbach (1879) bekannt:

Lautenbach beobachtete, daß bei Hunden die Injektion einer bestimmten Menge Nikotin in eine periphere Vene zu einer tödlichen Intoxikation führte. Dagegen aber hatte die Injektion der gleichen Menge Nikotin in die vena mesenterica keinen letalen Ausgang zur Folge, da das Nikotin in diesem Fall die Leber passieren mußte, um in den großen Kreislauf gelangen zu können.

Die Metabolisierung des Nikotins in der Leber läuft mit so hoher Geschwindigkeit ab, daß die durch Rauchen aufgenommene Nikotinmenge nicht zu schweren Nikotinvergiftungen führen kann.

In diesem Zusammenhang sind die Versuche von Clark (Clark et al., 1967) erwähnenswert, aus denen u.a. hervorgeht, daß Cotinin - das bedeutendste Abbauprodukt des Nikotins - bereits pharmakologisch weitgehend inaktiv und seine Wirkung am isolierten Meerschweinchendarm um den Faktor 10^{-5} geringer ist als die des Nikotins.

Neben seinen Metaboliten wird Nikotin selbst - wenn auch nur zu einem sehr geringen Teil - renal ausgeschieden (vgl. Abb. 2) (Corocoran et al., 1939; Haag et al., 1942; Lickint et al., 1956; Beckett et al., 1971).

2.2 Wirkung des Nikotins auf den Blutdruck

Es ist seit längerem bekannt, daß Rauchen zu einem akuten Blutdruckanstieg führt und daß dieses Verhalten auf das im Rauch enthaltene Nikotin zurückzuführen ist (Cryer et al., 1976; Cellina et al., 1975). Abb. 3 zeigt z.B. das Verhalten von Pulsfrequenz, systolischem und diastolischem Blutdruck während eines Rauchversuches mit zwei filterlosen Zigaretten. Als Vergleich dienten hier Versuchsbedingungen, bei denen die gleichen Einatemwiderstände wie beim Rauchen erzielt wurden ("sham smoking").

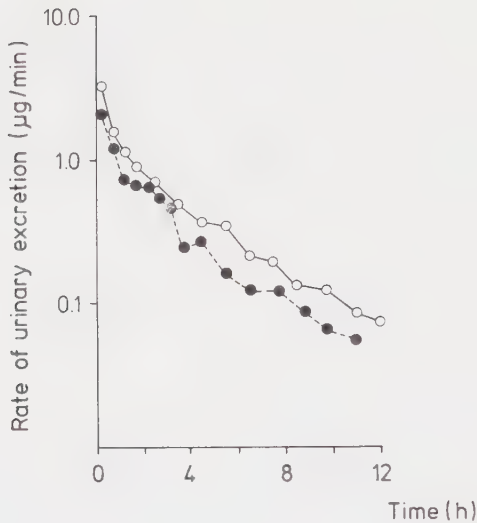


Abb. 2: Renale Ausscheidung von Nikotin beim Menschen nach intravenöser Zufuhr;
●: Raucher
○: Nichtraucher
(aus: Beckett et al., 1977).

Über die Zusammenhänge zwischen chronischer Nikotinzufuhr z.B. bei Gewohnheitsrauchern und dem Verhalten des Blutdrucks liegt in der Literatur noch keine einheitliche Meinung vor: Während in einer breit angelegten Studie aus jüngster Zeit (Greene et al., 1977) keine signifikanten Unterschiede im Blutdruck zwischen Rauchern und Nichtrauchern beobachtet wurden, geht aus mehreren anderen Untersuchungen hervor, daß der mittlere Blutdruck von Rauchern niedriger ist als der von Nichtrauchern (Karronen et al., 1959; Heath, 1958; Heyden-Stucky et al., 1965; Reid et al., 1967; Blackburn et al., 1960).

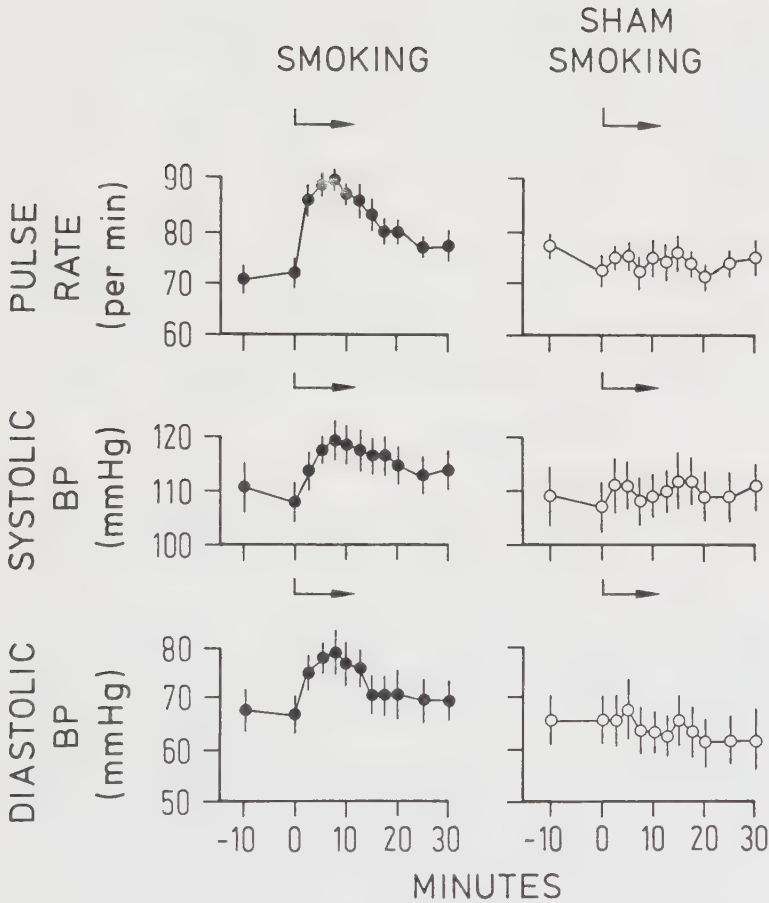


Abb. 3: Wirkung von Rauchen und simuliertem Rauchen ("sham smoking") beim Menschen auf Pulsfrequenz, systolischen und diastolischen Blutdruck (aus: Cryer et al., 1976).

Als weiterer Hinweis auf diese auf längere Sicht Blutdruck-senkende Wirkung kann der reziproke Zusammenhang von Zigarettenverbrauch und Blutdruck gelten (Clark et al., 1967). Für die Blutdruck-senkende Wirkung des Nikotins könnte auch die klinische Erfahrung sprechen, daß der Blutdruck nach dem Aufgeben des Rauchens häufig ansteigt (Gordon et al., 1975).

Eine akute und chronische Nikotinwirkung auf den Blutdruck konnte auch bei verschiedenen Langzeitversuchen an Ratten und Kaninchen gefunden werden. Es zeigten sich hier anfangs Blutdruckanstiege mit einem späteren Absinken unter das Ausgangsniveau (Wenzel et al., 1970; Wenzel et al., 1971).

2.3 Hormone der Nebennierenrinde

2.3.1 Physiologische Aspekte

In der Nebennierenrinde wird bekanntlich eine ganze Reihe von Hormonen gebildet, die in ihrer Gesamtheit als Steroide bezeichnet und in Glucocorticoide, Mineralcorticoide, Andogene und Östrogene unterteilt werden. Ihr gemeinsames chemisches Merkmal besteht im Cyclopentanoperhydrophenantren-Ringsystem (vgl. Abb. 4).

Die Biosynthese der Steroide geht vom Cholesterin aus, das durch Abspaltung der Isocapronsäurealdehyd-Seitenkette und durch die Einfügung von Sauerstoff in Pregnelon umgewandelt wird (Harper et al., 1975). Die von hier aus weiterführenden Schritte der Biosynthese sind in Abb. 5 dargestellt.

Wegen der hohen Geschwindigkeit der ablaufenden Synthesereaktionen liegen in physiologisch wirksamen Konzentrationen im allgemeinen nur das Mineralcorticoid Aldosteron und die Glucocorticoide Cortisol und Corticosteron vor. Bei allen Vertebraten werden hauptsächlich diese Steroide sezerniert. Im Verhältnis von Cortisol zu Corticosteron treten

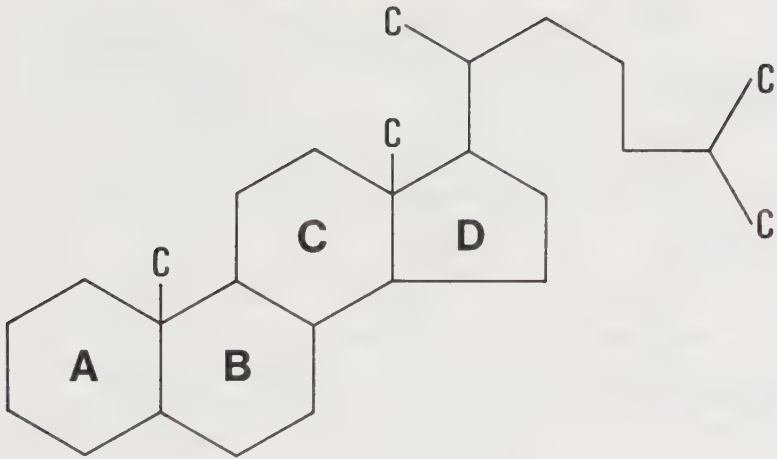


Abb. 4: Struktur des Cyclopentanoperhydrophenanten-Ringsystems.

allerdings spezieabhängige Unterschiede auf. So beträgt dieses Verhältnis beim Menschen etwa 7, bei Ratten ist es kleiner als eins, da überwiegend Corticosteron abgegeben wird (Ganong, 1971).

Die physiologischen Aldosteron-Plasmakonzentrationen (Aldosteron, Molekulargewicht: 360,45, systematischer Name: 11 β ,21-Dihydroxypregn-4-en-18-al-3,20-dion, $C_{21}H_{28}O_5$) liegen bei Ratten zwischen 50 und 600 ng/l (Hilfenhaus, 1976), die Sekretionsraten um 0,8 ng/100 g KG-min (Hilfenhaus, 1977b). Die Ausscheidungsrate im Urin ist wegen der Proteinbindung gering und liegt bei Ratten zwischen 0,8 und 2,2 ng/6 h (Hilfenhaus, 1977b).

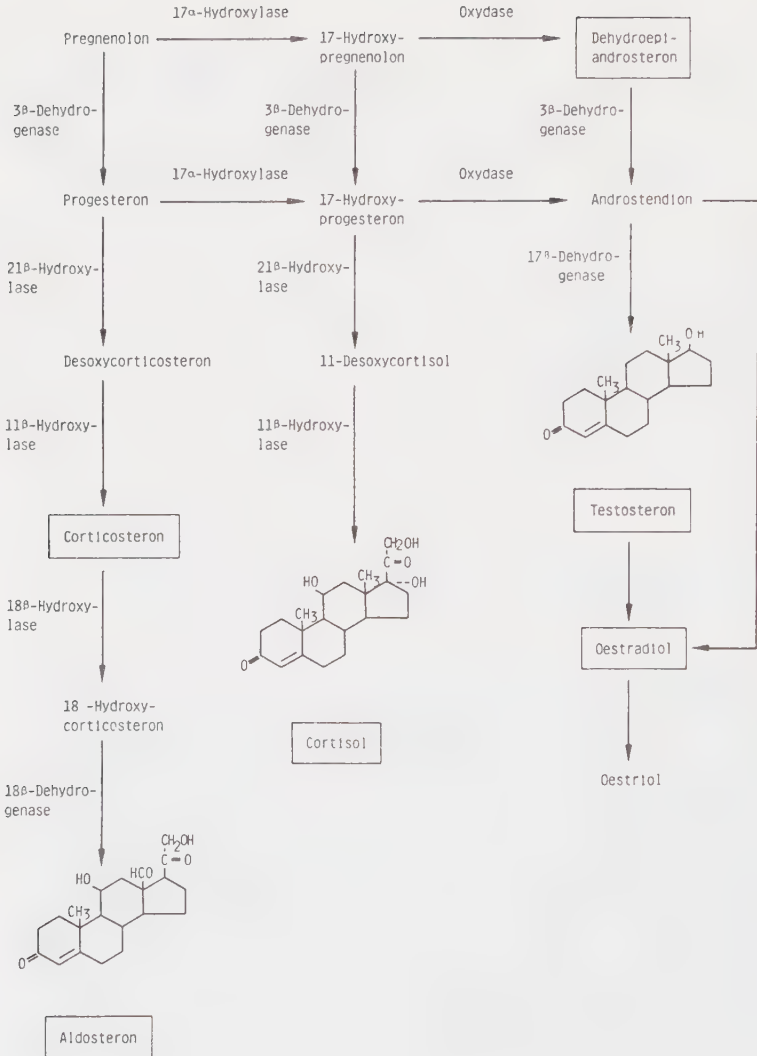


Abb. 5: Biosynthese der Steroide (aus: Kušchinsky, W., und Wahl, M., 1980).

Der Normalwert der Plasmakonzentration von Corticosteron (Corticosteron, Molekulargewicht: 346,47, systematischer Name: 11 β ,21-Dihydroxypregn-4-en-3,20-dion, C₂₁H₃₀O₄) liegt bei Ratten zwischen 70 und 300 ng/l, wobei die Sekretionsrate um 200 ng/100 g KG·min liegt (Hilfenhaus, 1976). Die relativ großen Schwankungen in den Normalwerten sind darauf zurückzuführen, daß sowohl die Corticosteron- als auch die Aldosteron-Plasmakonzentrationen eine ausgeprägte Tagesrhythmik aufweisen (Hilfenhaus, 1976; Armbuster, 1975; Ramaley, 1973; Williams et al., 1972). Ein weiterer Einfluß auf die Schwankungsbreite liegt darin, daß bei der quantitativen Bestimmung der Hormone wegen der außerordentlichen Empfindlichkeit der Methoden Artefakte auftreten können.

2.3.2 Regulation der Glucocorticoid-Plasmakonzentration

Die Steuerung der Glucocorticoid-Freisetzung in der Nebennierenrinde erfolgt über das System Hypothalamus-Hypophysenvorderlappen (vgl. Abb. 6). Durch Stimulation der peripheren Schmerzafferenzen und Stress (Fuller et al., 1977; Guha et al., 1976; Hodges et al., 1963) erfolgt die Freisetzung der Corticotropin-Releasing-Factors (CRF) aus der eminentia mediana des Hypothalamus. Über das limbische System und die Presso- und Volumenrezeptoren bestehen weitere Einflußmöglichkeiten. In den chromophoben Zellen des Hypophysenvorderlappens stimuliert der CRF die Ausschüttung des Adrenocorticotropen Hormones (ACTH). Über den Blutkreislauf gelangt das ACTH in die zona fasciculata der Nebennierenrinde und führt dort über eine Aktivierung des Adenylcyclase-cAMP-Systems zu einer gesteigerten Synthese und Sekretion der Glucocorticoide - im Fall der Ratte v.a. Corticosteron. Die daraus resultierende höhere Blutkonzentration der Glucocorticoide hemmt über einen negativen Rückkopplungsmechanismus die weitere Freisetzung von CRF und ACTH.

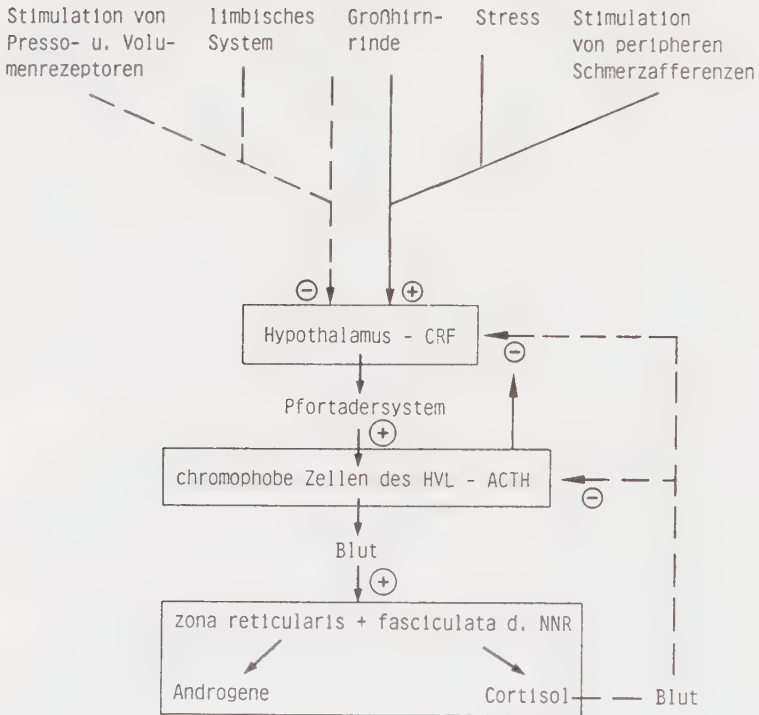


Abb. 6: Regulation der Glucocorticoid-Plasmakonzentration am Beispiel des Cortisols (aus: Kuschinsky, W., und Wahl, M., 1980).

2.3.3 Regulation der Aldosteron-Plasmakonzentration

Die Regulation der Aldosteron-Sekretion ist in Abb. 7 dargestellt und erfolgt im wesentlichen

1. über die Niere (Renin-Angiotensin-System)
2. über die Hypophyse (ACTH)
3. direkt bei Hyperkaliämie oder Hyponatriämie.

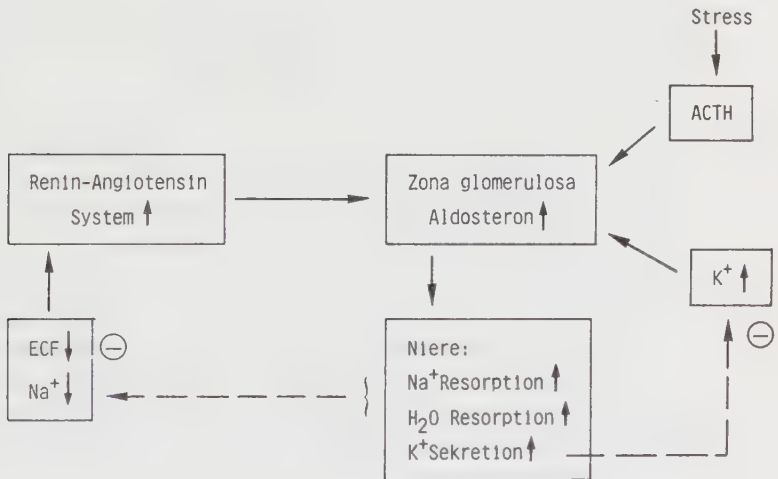


Abb. 7: Regulation der Aldosteron-Plasmakonzentration
(aus: Kuschinsky, W., und Wahl, M., 1980).

1. Die Reninfreisetzung aus den juxtaglomerulären Zellen der Niere wird durch Salzverlust (Brown et al., 1961; Veyrat et al., 1961; Mulrow et al., 1966; Blair-West et al., 1971), Hypovolämie (Vander, 1967; Blaire et al., 1970; Skinner et al., 1961) und/oder arterielle Hypotonie

(Laragh et al., 1973; Möhring et al., 1972) stimuliert. Außerdem soll die lokale Renin-Aktivität bei Erhöhung der Na^+ -Konzentration im distalen Tubulus ansteigen (Thurau et al., 1965; Thurau et al., 1967).

Renin ist eine Protease, die aus dem in der Leber synthetisierten Angiotensinogen Angiotensin I bildet. Durch das Converting-Enzym erfolgt im Blut, in der Niere und in der Lunge die Umwandlung von Angiotensin I in das stark vaso-konstriktorisch wirksame Angiotensin II. In der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde bewirkt Angiotensin II die Freisetzung von Aldosteron.

2. ACTH stimuliert neben der Glucocorticoid-Sekretion in hohen, aber noch physiologischen Mengen auch die Freisetzung von Aldosteron (Holzbauer, 1961; Ganguly et al., 1977; Hilfenhaus, 1977b; Blair-West, 1976).
3. Die direkte Beeinflussung der Aldosteron-Freisetzung durch Hyperkaliämie und Hyponatriämie konnte dadurch gezeigt werden, daß die Perfusion der Nebenniere mit Lösungen, deren Natriumgehalt erniedrigt oder deren Kaliumgehalt im Vergleich zum normalen Plasma erhöht war, zu einer verstärkten Aldosteron-Freisetzung führte (Blair-West et al., 1963; Davis et al., 1965).

2.4 Einflüsse von Nikotingaben bzw. Tabakrauchinhalation auf die Glucocorticoide

2.4.1 Mensch

2.4.1.1 Tabakrauchinhalation

Die Wirkung von Zigarettenrauch auf Ausschüttung und Ausscheidung von Glucocorticoiden beim Menschen war bereits Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Die resultierenden Ergebnisse sind jedoch teils widersprüchlich.

Höckfelt (1961) berichtet über Versuche an gewohnheitsmäßigen Nichtraucher, bei denen nach dem Inhalieren von zwei filter-

losen Zigaretten die Plasmacortisolkonzentration und die 17-OH-Corticosteroide im Urin bestimmt wurden. Die 17-OH-Corticosteroide (17-Hydroxy-Corticosteroide) wurden nach der sogenannten Porter-Silber-Methode gemessen (Silber et al., 1954), mit der Cortisol, Cortison und deren Abbauprodukte bestimmt werden. Dabei ergab sich bei Nichtrauchern ein zweistündiger Anstieg der Plasma-Cortisol-Konzentration um über 100% gegenüber den Kontrolltagen. Der Normalbereich wurde erst nach zwei weiteren Stunden erreicht. Die Ausscheidung der 17-OH-Corticosteroide stieg um etwa 30%. Im Gegensatz dazu wurden bei Gewohnheitsrauchern unter gleichen Versuchsbedingungen weder Änderungen der Plasma-Cortisol-Konzentration noch der 17-OH-Corticosteroide im Urin beobachtet.

Kershbaum et al. (1967a, 1967b, 1968) führten ihre Versuche ebenfalls an Gewohnheitsrauchern durch, wobei sie die 11-Hydroxy-Corticosteroide im Plasma bestimmten. Diese Meßmethode (Mattingly, 1954) erfaßt Aldosteron, Corticosteron und Cortisol. Bei den Untersuchungen zeigte sich auch in dieser Personengruppe nach dem Rauchen von 4 Filterzigaretten ein Anstieg der 11-Hydroxysteroide im Plasma um durchschnittlich 47%. Die dem circadianen Rhythmus entsprechenden Normalwerte wurden hier nach etwa 2 Stunden wieder erreicht. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen auch Winternitz et al. (1977).

Tucci et al. (1972) verglichen die Plasma-Cortisolspiegel und die Ausscheidung der 17-OH-Corticosteroide von Gewohnheitsrauchern bei individuellem Zigarettenverbrauch und einer Gruppe von Nichtrauchern ohne Zigarettenbelastung. Die Plasmacortisolspiegel der beiden Gruppen waren vergleichbar. Bei der Ausscheidung der 17-OH-Corticosteroide wurden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Untersuchungen an Gewohnheitsrauchern über den Einfluß von Zahl und Nikotingehalt der gerauchten Zigaretten auf die

Plasmakonzentration von Cortisol und Corticosteron führten Hill et al. (1974) durch. Nach dem Inhalieren von zwei Zigaretten erfolgte ein signifikanter Anstieg nur bei Zigaretten mit relativ hohem Nikotingehalt (2,73 mg/Zigarette). Innerhalb von 10 Minuten nach dem Rauchen stiegen die Konzentrationen auf etwa die doppelte Höhe des Ausgangswertes. Nach dem anschließenden Rauchen von 5 weiteren Zigaretten stiegen die Konzentrationen nochmals an.

Zwei neue Arbeiten (Spohr, 1979; Bender et al., 1978) bestätigen diesen Zusammenhang zwischen Nikotingehalt der Zigaretten und der daraus resultierenden Erhöhung des Plasma-Cortisolspiegels. Bender et al. (1978) haben dabei auch einen Anstieg des Plasma-ACTH-Spiegels nach Rauchbelastung gemessen.

Einen signifikanten Anstieg des Plasma-Cortisols beobachteten auch Cryer et al. (1976) 15 Minuten nach dem Rauchen von zwei filterlosen Zigaretten durch Gewohnheitsraucher (vgl. Abb. 8).

2.4.1.2 Direkte Nikotingaben

Bei den im vorangegangenen Kapitel aufgeführten Untersuchungen wurde den Versuchspersonen das Nikotin durch inhalierten Tabakrauch zugeführt. Untersuchungen über die Beeinflussung der Glucocorticoide durch direkt zugeführtes Nikotin (z.B. s.c. oder i.v.) liegen für den Menschen bisher noch nicht vor.

2.4.2 Tiere

2.4.2.1 Tabakrauchinhalation

Untersuchungen über die Wirkung von Zigarettenrauch auf die Glucocorticoide von Tieren sind bisher noch nicht beschrieben worden.

2.4.2.2 Direkte Nikotingaben

Für verschiedene Spezies liegen Ergebnisse über die Wirkung von direkt zugeführtem Nikotin auf die Glucocorticoide vor:

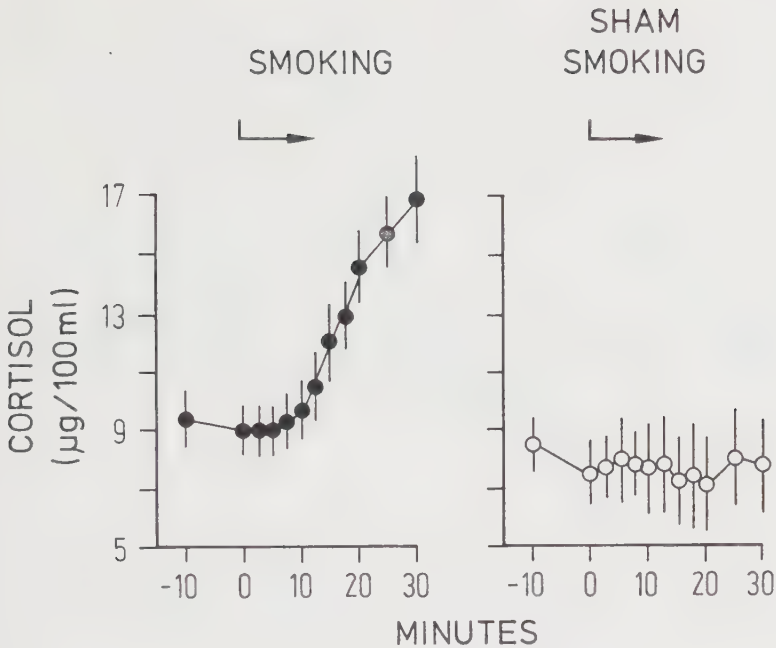


Abb. 8: Wirkung von Rauchen und simuliertem Rauchen ("sham smoking") beim Menschen auf den Plasma-Cortisolspiegel (aus: Cryer et al., 1976).

An narkotisierten Hunden beobachteten Kershbaum et al. (1968) eine Stunde nach der Gabe von 0,9 mg/kg KG Nikotin-Bitartrat i.v. einen signifikanten Anstieg der 11-Hydroxy-Corticosteroide im Plasma um 64%. Die Ausgangskonzentrationen dieser Hormone wurden nach 3 Stunden wieder erreicht (vgl. Abb. 9).

Suzuki et al. (1973) untersuchten die Veränderung der Sekretionsrate der 17-Hydroxy-Corticosteroide bei wachen und nar-

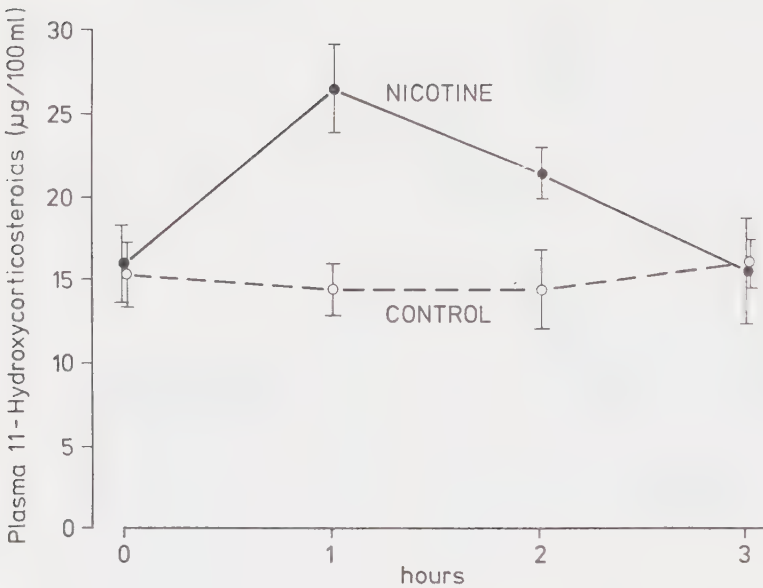


Abb. 9: Plasmakonzentration der 11-Hydroxy-Corticosteroide (Corticosteron, Cortisol, Aldosteron) bei Hunden nach der intravenösen Gabe von 0,9 mg/kg KG Nikotin-Bitartrat (aus: Kershbaum et al., 1968).

kotisierten Hunden. Bei beiden Gruppen ergaben sich ähnliche Anstiege dieser Sekretionsraten (im Mittel von $0,12 \pm 0,025 \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ auf $1,61 \pm 0,22 \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$) (vgl. Abb. 10).

Da nach erfolgter Hypophysektomie der Anstieg der Sekretionsrate ausblieb, wurde die Stimulierung der NNR auf eine durch Nikotin ausgelöste ACTH-Ausschüttung zurückgeführt.

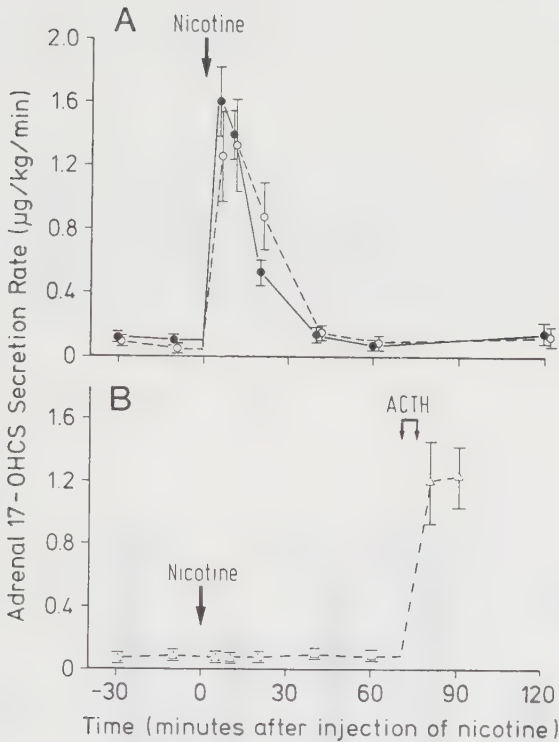


Abb. 10: Sekretionsrate der 17-Hydroxy-Corticosteroide (Cortisol, Cortison und deren Abbauprodukte) bei Hunden; oben: ohne (●—●) und mit (○—○) Pentobarbital-Narkose vor und nach der intravenösen Gabe von 0,1 mg/kg KG Nikotin; unten: Versuche mit hypophysektomierten Hunden mit anschließender Injektion von 2 I.U./kg KG ACTH (aus: Suzuki et al., 1973).

Bei Ratten (Kershbaum et al., 1968) führte die Gabe von 0,5 mg/kg KG Nikotin-Bitartrat i.p. ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der Plasma-11-Hydroxy-Corticosteroide (vgl. Abb. 11).

Nach 90 Minuten waren die Ausgangswerte wieder erreicht.

Bei einem Vergleich der Corticosteron-Plasmakonzentrationen von gestressten und ungestressten Ratten beobachteten Balfour et al. (1975a) bei dem ungestressten Kollektiv einen signifikanten Anstieg dieses Parameters durch Nikotingabe für

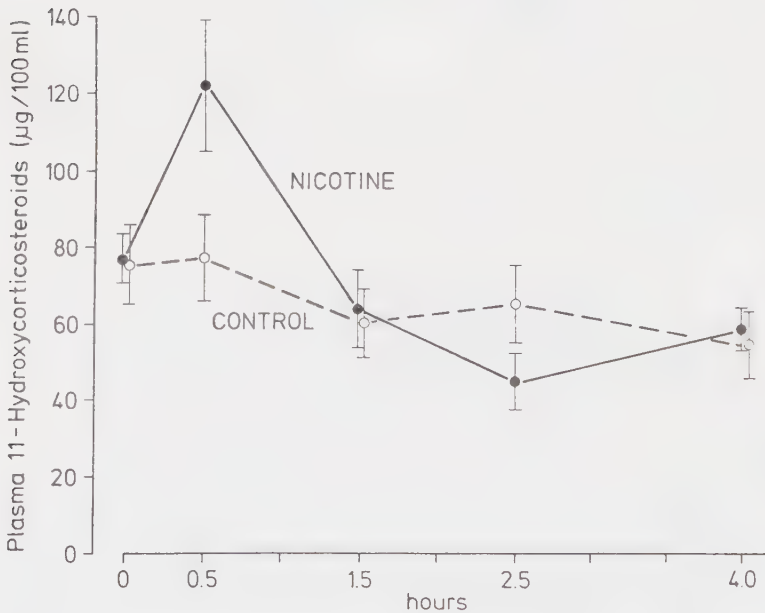


Abb. 11: Plasmakonzentration der 11-Hydroxy-Corticosteroide bei Ratten nach 0,5 mg/kg KG Nikotin-Bitartrat i.p. (aus: Kershbaum et al., 1968).

mindestens 60 Minuten. Ratten, die durch Sitzen auf einer erhöhten Plattform gestresst wurden, wiesen eine stark erhöhte Corticosteron-Plasma-Konzentration auf. Durch Nikotin-gabe konnte sie nicht noch weiter gesteigert werden (vgl. Abb. 12, 13, 14).

Dagegen konnten Balfour et al. (1975b) eine Stunde nach der Gabe von 0,4 mg/kg KG Nikotin keine signifikanten Unterschiede in der Corticosteron-Plasma-Konzentration bei Ratten feststellen. Messungen der Hormone zu einem früheren Zeitpunkt nach der Nikotिंगabe führten sie allerdings nicht durch.

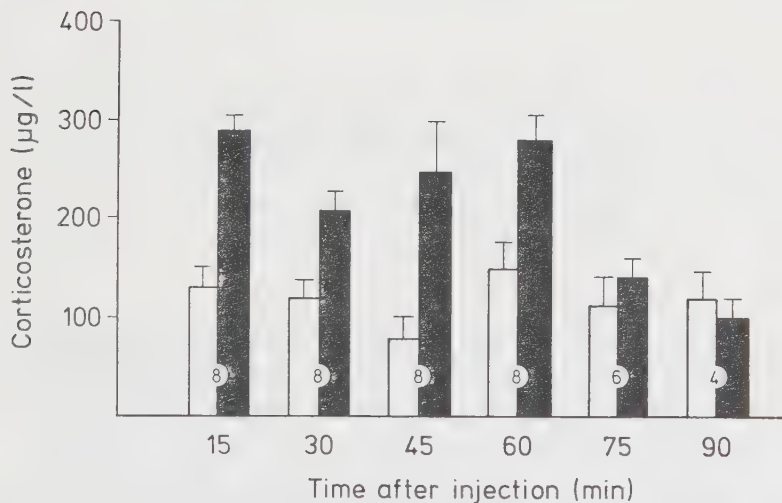


Abb. 12: Wirkung von Nikotin auf die Plasmakonzentration von Corticosteron bei ungestressten Ratten; helle Blöcke: Kontrolle; schwarze Blöcke: Nikotin (aus: Balfour et al., 1975a).

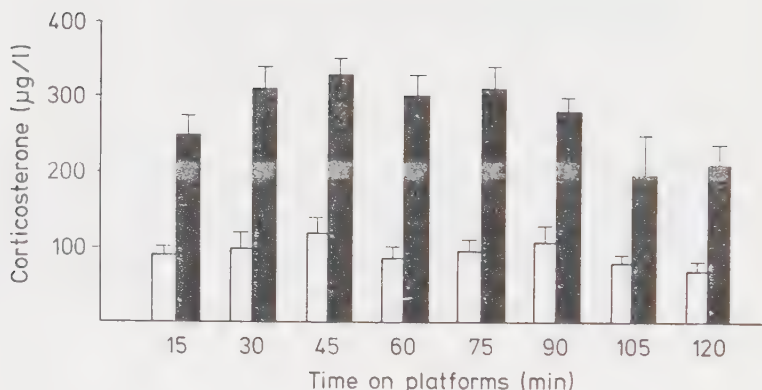


Abb. 13: Wirkung von Stress (Sitzen auf einer kleinen, erhöhten Plattform) auf die Plasmakonzentration von Corticosteron bei Ratten;
helle Blöcke: Kontrolle; schwarze Blöcke: Stress
(aus Balfour et al., 1975a).

Nach der Gabe von 0,4 mg/kg KG Nikotin s.c. trat bei Ratten auch bei den Versuchen von Turner (1975) ein Anstieg des Plasmaspiegels von Corticosteron auf.

2.4.3 In vitro

Rubin (1975) beschrieb eine dosisabhängige Steigerung der Corticosteroid-Produktion von isolierten Zellen der Katzen-Nebennierenrinde durch Nikotin. Bereits bei Nikotinkonzentrationen von 6 µM konnte ein kleiner Anstieg der Corticosteroid-Freisetzung beobachtet werden, der bei 60 µM Nikotin 65% und bei 600 µM 150% betrug.

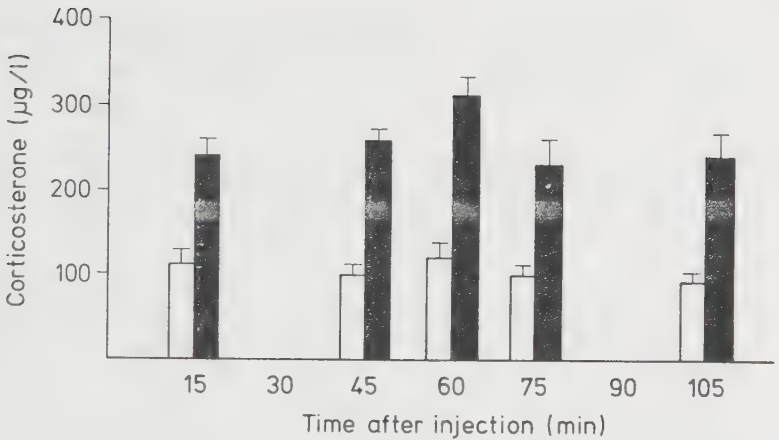


Abb. 14: Wirkung von Nikotin auf die Plasmakonzentration von Corticosteron bei gestressten Ratten (Sitzen auf einer kleinen, erhöhten Plattform); helle Blöcke: Kontrolle; schwarze Blöcke: Nikotin (aus: Balfour et al., 1975a).

2.5 Einflüsse von Nikotingaben bzw. Tabakrauchinhalation auf die Mineralcorticoide

Untersuchungen über die Beeinflussung der Mineralcorticoid-Plasmaspiegel durch Tabakrauch-Inhalation oder Nikotininjektionen sind bisher nicht mitgeteilt worden. Lediglich aus einer Arbeit (Hökfelt, 1961), in der die Aldosteronausscheidung im Urin bei Menschen in Abhängigkeit vom Zigarettenkonsum untersucht wurde, geht eine Beeinflussung durch Zigarettenrauch-Inhalation hervor:

Hierbei bestimmte Hökfelt die Aldosteronausscheidung im Urin von Personen, die normalerweise nicht rauchten, nach dem Inhalieren von 2 filterlosen Zigaretten. Neben einer deutlichen

Verringerung des Urinvolumens trat auch eine Verminderung der im Urin ausgeschiedenen Aldosteronmenge auf (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1: Urinvolumen und Aldosteronausscheidung im Urin beim Menschen mit und ohne Zigarettenrauchbelastung (aus: Hökfelt, 1961)

Name	ohne Zigaretten		2 filterlose Zigaretten	
	Urin- volumen (ml/8 h)	Aldosteron- ausschei- dung ($\mu\text{g}/8\text{ h}$)	Urin- volumen (ml/8 h)	Alsoteron- ausschei- dung ($\mu\text{g}/8\text{ h}$)
M.N.	420	7	310	2
B.A.	440	4	170	2
S.H.	540	5	430	1
P.H.	610	8	470	3
H.S.	480	6	365	4
K.S.	510	3	480	2
A.R.	460	2	450	3

Außerdem wurde die Aldosteronausscheidung im Urin bei 10 Gewohnheitsrauchern gemessen, die zwischen 8 und 16 $\mu\text{g}/\text{Tag}$ (bei einem Mittelwert von 7,6 $\mu\text{g}/\text{Tag}$) schwankte. Bei Nichtrauchern betrugen diese Werte 1 bis 10 $\mu\text{g}/\text{Tag}$ (Mittelwert: 5,4 $\mu\text{g}/\text{Tag}$).

Eine genauere Darstellung der Ergebnisse und eine Erklärung für diese Beobachtungen wurden allerdings nicht gegeben.

3. PROBLEMSTELLUNG UND VERSUCHSPLAN

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung adrenocorticaler Funktionen bei Ratten unter Nikotin- bzw. Zigarettenrauchbelastung.

Als Parameter für die Funktionen der Nebennierenrinde dienten für die Glucocorticoide das Corticosteron und als Mineralcorticoid das Aldosteron. Zur Bestimmung der Plasmakonzentrationen dieser Hormone konnte auf eine bestehende Meßmethode (Murphy, 1971) zurückgegriffen werden, die sich aus Extraktion der Steroide aus dem Plasma, ihrer chromatographischen Auftrennung und der anschließenden radioimmunologischen Bestimmung der Hormone zusammensetzte. Insbesondere der bedeutende Schritt der Chromatographie war bei der bestehenden Methode hinsichtlich Reproduzierbarkeit und routinemäßiger Anwendbarkeit stark verbesserungsfähig.

Für die Bestimmung der beiden Hormone ist ein relativ großes Blutvolumen von etwa 2 ml erforderlich. Anfänglich wurde das Blut durch Entbluten der mit Äther oder Nembutal narkotisierten Tiere aus der aorta abdominalis gewonnen.

Nach einer genaueren Untersuchung dieses Vorgehens erwies sich diese Technik allerdings als ungünstig, da insbesondere die Glucocorticoid-Plasmakonzentration durch Narkose und operativen Eingriff stark beeinflusst wurde. Aus diesem Grund wurde längere Zeit mit arteriellen Dauerkathetern experimentiert. Die besten Erfolge konnten dabei mit Dauerkathetern nach Weeks (1978) erzielt werden, jedoch lagen auch hier die größten Schwierigkeiten darin, daß eine Blutentnahme von mehr als 500 µl über mehrere Wochen wegen der reaktiven Gefäßveränderungen nicht gewährleistet blieb.

Als Alternativmethode wurde daraufhin das Blut nach Decapitation gesammelt. Bei Vorversuchen mit fraktioniertem Sammeln

des Blutes zeigten sich keine Änderungen im Aldosteron-Plasmaspiegel während des etwa 30 Sekunden dauernden Entblutens. Es wurden Langzeitversuche über 8 Wochen mit Berauchung bzw. subcutanen Nikotingaben durchgeführt (vgl. Versuchsplan). Zur Klärung der Frage, ob Nikotin-abhängige Veränderungen der Steroid-Plasmakonzentrationen durch ACTH moduliert werden, wurden außerdem Langzeitversuche mit Dexamethasongaben zur Unterdrückung der ACTH-Freisetzung durchgeführt (vgl. Versuchsplan).

Versuchsplan

adrenocorticale Funktionen unter Nikotin bei Ratten

verminderte ACTH-Ausschüttung
durch Dexamethason

normale ACTH-Ausschüttung

Kurzzeitversuch
über 30 Stunden

Langzeitversuche über 8 Wochen

Langzeitversuche über 8 Wochen

Berauchung

Berauchung

s.c. Nikotingaben

Berauchung

s.c. Nikotingaben

Rauchgruppe
(Rauchmaschine bei
Zigarettenrauch)

Rauchgruppe
(Rauchmaschine bei
Zigarettenrauch)

Nikotin s.c.
(2x tägl.
0,5 mg/kg KG)

Nikotin s.c.
(2x tägl.
0,5 mg/kg KG)

Rauchgruppe
(Rauchmaschine bei
Zigarettenrauch)

Nikotin s.c.
(2x tägl.
0,5 mg/kg KG)

Nikotin s.c.
(2x tägl.
1 mg/kg KG)

Maschinengruppe
(Rauchmaschine bei
Frischluft)

Maschinengruppe
(Rauchmaschine bei
Frischluft)

NaCl-Lösung s.c.

NaCl-Lösung s.c.

Maschinengruppe
(Rauchmaschine bei
Frischluft)

NaCl-Lösung s.c.

NaCl-Lösung s.c.

Käfiggruppe
(nur Käfig)

Käfiggruppe
(nur Käfig)

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche Ratten des Stammes Chbb: THOM(SPF) (Dr. K. Thomae GmbH, Biberach a.d. Riss) verwendet, die zu Versuchsbeginn ein Gewicht von 220 bis 250 Gramm hatten. Sie wurden unter Altromin-Standard-Diät (vgl. Anhang) und Leitungswasser ad libitum zu viert pro Käfig gehalten.

4.2 Berauchung

Die bei den Versuchen verwendeten Zigaretten und Rauchmaschinen wurden vom Forschungsrat Rauchen und Gesundheit, Hamburg, zur Verfügung gestellt.

Die Zigaretten hatten die Bezeichnung "Einheitszigarette '76 (EZ '76)" und wiesen folgende Spezifikationen auf:

Tabelle 2: Analysenergebnisse der Einheitszigarette '76
(Angaben des Forschungsrates Rauchen und Gesundheit, Hamburg)

Gewicht (mg/Zig.)	1043
Gesamtzugwiderstand (mmWS)	120
Filterzugwiderstand (mmWS)	82
Luftdurchlässigkeit (l/h)	107.2
Zugzahl	8.5
Feuchtkondensat (mm/Zig.)	16.2
Trockenkondensat (mm/Zig.)	13.9
Rauchnikotin (mg/Zig.)	0.84
Tabaknikotin (%)	1.32
CO im Rauch (Vol. %)	4.24

Eine Rauchmaschine vom Typ Hamburg (vgl. Dontenwill et al., 1967, Dontenwill, 1970) zeigt Abb. 15.

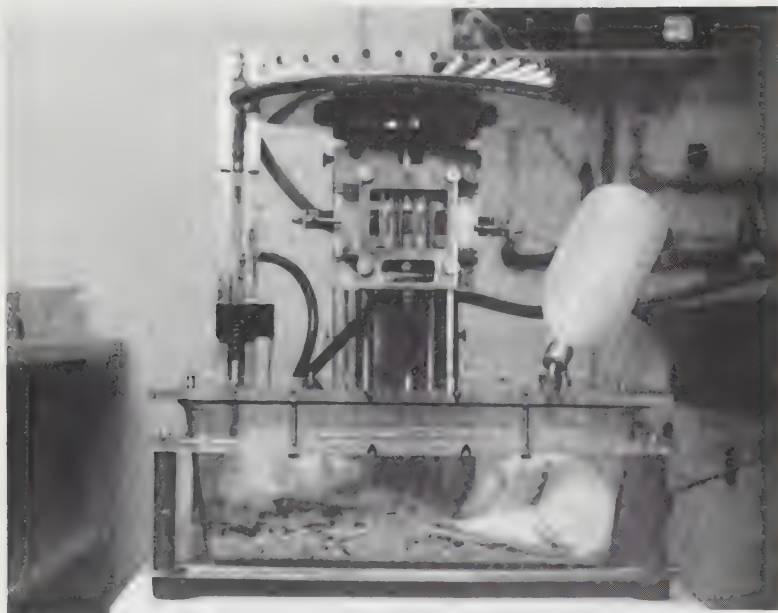


Abb. 15: Rauchmaschine Typ Hamburg (modifiziert).

Die Maschinen waren ursprünglich mit jeweils 10 radial um den Rauchauslaß angeordneten Plexiglasröhren von ca. 35 mm Durchmesser zur Aufnahme der Tiere ausgestattet. Durch diese Bauweise wurde ein relativ geringes Luftvolumen der Berauchungskammer erreicht. Diesem Vorteil stand allerdings der Nachteil gegenüber, daß sich während der Berauchungsphasen in den Röhren durch die Körperwärme der Tiere ein starker Wärmestau entwickelte. Außerdem hatten die Tiere während der Berauchung keine Zugangsmöglichkeit zu Trinkwasser.

Es war bei den vorgesehenen Versuchen zu erwarten, daß sowohl die Erhöhung der Umgebungstemperatur als auch der fehlende Wasserzugang die Ausschüttung der Mineralcorticoide erheblich beeinflussen würde. Außerdem stellte es für die Tiere eine z.T. erhebliche Stressbelastung dar, wenn sie in die Röhren hinein- bzw. wieder hinausgebracht werden sollten. Eine hierdurch hervorgerufene Auswirkung auf die Glucocorticoid-Plasmakonzentrationen war ebenfalls denkbar. Aus diesen Gründen wurden als Rattenaufnahmebehälter anstelle der Plexiglasröhren die Rattenkäfige verwendet, in denen die Ratten auch normalerweise untergebracht waren. Sie wurden mit einem Plexiglasdeckel luftdicht abgeschlossen, der mit Öffnungen für den Trinkwasserzugang, die Rauchzuführung und die Entlüftung versehen war. Ein wesentlicher Temperaturanstieg in den Rauchkammern erfolgte nun nicht mehr, außerdem war ein Umsetzen der Tiere in spezielle Berauchungskammern nicht erforderlich.

Das Mischungsverhältnis von Rauchvolumen und Frischluftvolumen betrug 35 ml/200 ml.

Bei den Berauchungsversuchen wurden die Tiere der sog. Rauchgruppen (n = 12) in den Rauchmaschinen mit Einheitszigaretten EZ '76 beraucht. Bei dem Kurzzeitversuch erfolgte die Berauchung über 30 Stunden mit 5 Zigaretten je Ratte und Stunde (insgesamt 150 Zigaretten je Tier).

Den Versuchen mit mehrwöchiger Berauchung ging eine einwöchige Gewöhnungsphase voraus, während der die Tiere zweimal täglich je 30 Minuten an die veränderten Umgebungsbedingungen in den Rauchmaschinen ohne Rauchbelastung gewöhnt wurden. Danach betrug die Zigaretten-dosierung in den ersten beiden Wochen 4 Zigaretten pro Ratte und Tag. In den beiden folgenden Wochen wurde die Dosis verdoppelt und danach nochmals auf 15 Zigaretten pro Ratte und Tag erhöht. Die Berauchung war bei den Langzeitversuchen in zwei halbstündige Phasen vormittags und nachmittags aufgeteilt.

Zur Ermittlung der Kontrollwerte wurden die sog. Maschinen-
gruppen (n = 12) über vergleichbare Zeiträume bei Frischluft-
zufuhr in den Rauchmaschinen gehalten.

Bei den Langzeitversuchen wurden als weitere Vergleichskol-
lektive die Tiere der sog. Käfiggruppen (n = 12) verwendet,
die während der gesamten Versuchsdauer ausschließlich in
den normalen Tierkäfigen gehalten wurden.

4.3 Nikotindosierung

Die Firma Dr. R. Hallermeyer, Augsburg, lieferte das (-)-
Nikotin gaschromatographisch rein als freie Base in 1 ml-
Ampullen unter Stickstoff.

Zur Bestimmung der Nikotindosierungen wurde Ratten Nikotin
in ansteigenden Mengen s.c. verabreicht.

Als Dosierung für die Langzeitversuche wurde die Hälfte der-
jenigen Dosierung festgelegt, bei der nach einmaliger s.c.-
Injektion noch die Hälfte der Tiere gekrampft hatte.

Die daraufhin festgelegten Nikotindosierungen betrugen für

- a) Nikotin gelöst in physiologischer Kochsalzlösung: 0,5 mg/
kg KG
- b) für Nikotin gelöst in Olivenöl: 1,0 mg/kg KG.

Diese Mengen führten bei täglich zwei Injektionen während der
Langzeitversuche nie zu Krämpfen.

Die Konzentrationen der Injektionslösungen wurden so ange-
setzt, daß das Injektionsvolumen für

- a) die NaCl-Lösung 1 ml/kg KG, und für
 - b) die ölige Lösung 0,5 ml/kg KG
- betrug.

Den Versuchen mit Nikotingaben ging eine einwöchige Gewöh-
nungsphase voraus, während der die Tiere nur physiologische
Kochsalzlösung bzw. Öl erhielten.

Die Tiere der Kontrollgruppen erhielten jeweils nur 0,9%ige NaCl-Lösung (1 ml/kg KG) bzw. nur Olivenöl (0,5 ml/kg KG) zweimal täglich subcutan.

4.4

Dexamethasondosierung

Dexamethason-21-dinatrium-phosphat ("Decadron-Phosphat"-Injektionslösung) wurde von der Firma Sharp & Dohme GmbH, München, zur Verfügung gestellt.

Durch wöchentlich zwei s.c. Injektionen von Dexamethason-21-dinatrium-phosphat in ansteigenden Dosierungen wurde diejenige Menge bestimmt, durch die die Corticosteron-Plasmakonzentration über mehrere Wochen auf Werte unter 5 ng/ml gesenkt werden konnte.

Folgende Dosierung erwies sich als zweckmäßig:

1 1/2 Wochen: 2mal wöchentlich 1 mg/kg KG Dexamethason-21-dinatrium-phosphat
entsprechend 0,833 mg/kg KG Dexamethason
(insgesamt 3 Injektionen);

danach: 2mal wöchentlich 0,5 mg/kg KG Dexamethason-21-dinatrium-phosphat
entsprechend 0,417 mg/kg KG Dexamethason.

4.5

Blutgewinnung

Um die unmittelbaren Einflüsse der Versuchsbedingungen auf die Steroid-Plasmaspiegel auszuschalten, fand die Blutentnahme bei den Versuchen mit mehrwöchiger Berauchung erst 3 1/2 Stunden nach der letzten Berauchung bzw. Nikotingabe statt.

Bei dem Kurzzeitversuch erfolgte die Blutentnahme unmittelbar nach Versuchsbeendigung.

Zur Blutgewinnung wurden die Ratten zwischen 14 und 15 Uhr decapitiert. Das Blut wurde in einem heparinisierten Trich-

ter aufgefangen und in einem ebenfalls heparinisierten Kunststoffröhrchen gesammelt. Anschließend wurde das Blut für 10 Minuten bei 2700 ms^{-2} und 4° C zentrifugiert. Danach wurde das Plasma abgetrennt. Je $1000 \mu\text{l}$ der Plasmaproben wurden bei -40° C in Eppendorf-Reaktionsgefäßen tiefgefroren.

4.6 Bestimmung der Hormonkonzentrationen im Plasma

4.6.1 Material

Die radioaktiv markierten Steroide (1,2,6,7- ^3H)-Aldosteron und (1,2,6,7- ^3H)-Corticosteron wurden von Amersham Buchler, Braunschweig, geliefert. Beide Steroide hatten eine spezifische Aktivität von 95 Curies/mmol und wurden in einer Toluol-Äthanol-Lösung geliefert.

Als unmarkierte Steroide für die Eichreihe des RIAs wurden Aldosteron von Merck (Art. 24599) und Corticosteron von Schering (Art. ZK-4827) verwendet.

Die Chromatographiesäulen wurden von der Firma Bender & Hobein, München, angefertigt. Ihr Innendurchmesser betrug 11 mm, die Gelhöhe 600 mm. Die Fritte hatte eine Porenweite zwischen 40 und 90 μm .

Als Chromatographiegel wurde Sephadex LH 20 von Pharmacia verwendet, als Laufmittel diente bei der Chromatographie ein Gemisch von 98 Vol. % Dichlormethan (p.a.; Merck) und 2 Vol. % Methanol (p.a.; Merck).

Die Stammlösung bestand aus 6,184 g Borsäure (p.a.; Merck), 7,456 g Kaliumchlorid (p.a.; Merck), 78 ml 0,1 n NaOH und wurde mit aqua dest. auf 2000 ml aufgefüllt. Der pH der Lösung betrug 8,0.

Der C-Puffer bestand aus 150 mg Gammaglobulin (Beriglobin, Behringwerke) und 162,5 mg Natriumazid und wurde auf 500 ml mit der Stammlösung aufgefüllt.

Die Dextran-Kohle-Suspension bestand aus 250 mg Dextran und 2500 mg Aktivkohle Norit A (Serva, Heidelberg) und wurde auf 100 ml mit C-Puffer aufgefüllt. Als Szintillationsflüssigkeit diente Dioxan-Cocktail (Packard, Frankfurt) bzw. Quickszint 212 (Zinnser, Frankfurt). Die Radioaktivität wurde in einem Beta-Zähler LS 8100 (Beckman Instruments) bestimmt.

Die Antikörper für den RIA stellte Herr Prof. Vecsei, Heidelberg, für die Versuche zur Verfügung. Der Aldosteron-Antikörper hatte die Bezeichnung Schaf 29/2, der Corticosteron-Antikörper stammte von Kaninchen Nr. 19.

4.6.2 Ansatz

Zur späteren Bestimmung der Recovery wurden Lösungen angesetzt, die für Corticosteron eine Aktivität von ca. 4000 cpm/200 μ l C-Puffer und für Aldosteron von ca. 2000 cpm/200 μ l C-Puffer hatten. Bei Bedarf wurden die Plasmaproben bei Zimmertemperatur aufgetaut. In speziell gefertigten Spitzgläsern wurden zu 750 μ l Plasma je 200 μ l der radioaktiven Steroid-Lösungen gegeben. Nach vorsichtigem Vortexen wurden die Proben mindestens 2 Stunden bei 4° C inkubiert. Der 100% Recovery-Ansatz (ebenfalls je 200 μ l der beiden radioaktiven Steroid-Lösungen) wurde direkt in Szintillationsfläschchen pipettiert und nach Zugabe von 10 ml Szintillationsflüssigkeit im Counter gezählt.

4.6.3 Extraktion

Der Ansatz wurde nach dem Inkubieren mit 10 ml Dichlormethan versetzt und im Drehschüttler für 15 Minuten geschüttelt. Danach wurde die Steroid-haltige Dichlormethanphase mittels einer modifizierten Pasteurpipette von der überstehenden wässrigen Phase getrennt und in ein zweites Glas überführt. Dieses Volumen wurde mit 3 ml destilliertem Wasser versetzt und 30 Sekunden von Hand kräftig geschüttelt. Der Dichlormethan-Unterstand wurde dann mittels derselben Pi-

pette in ein weiteres Spitzglas überführt. Das Einengen und Abdampfen dieses Extraktes erfolgte unter gereinigtem Stickstoff in einem Wasserbad mit 40° C.

Nach dem Abdampfen wurden in das Spitzglas 400 µl Laufmittel pipettiert, gut gevortext, und das Volumen in eine 1 ml Tuberkulinspritze aufgezogen. Mit 100 µl Laufmittel wurde das Spitzglas nochmals ausgespült und dieses Volumen ebenfalls in die Spritze aufgezogen. Das gesamte Probenvolumen von 500 µl wurde dann auf die Oberfläche des Chromatographie-Gels vorsichtig aufgegeben.

4.6.4 Chromatographie

Die chromatographische Auftrennung von Corticosteroiden mit dem Gel Sephadex LH 20 hat sich bereits vielfach bewährt (Bourne, 1974; Castro et al., 1973, 1974; Daniel et al., 1974; Golder et al., 1976; Ichikawa et al., 1974; Murphy, 1971; Nowaczynski et al., 1974; Sippell et al., 1975, 1978).

4.6.4.1 Aufbau der Chromatographieranlage

Die Chromatographieranlage befand sich in einem Kühlraum bei 4° C. Das für die Chromatographie verwendete Gel Sephadex LH 20 wurde abends mit Laufmittel angesetzt. Der Quellfaktor betrug 3,8 ml Laufmittel pro g trockenes Gel.

Nach dem Quellen über Nacht wurde das Gel bis zu einer Höhe von 60 cm in die Säulen eingefüllt. Nach vierstündigem Einlaufen waren die Säulen betriebsbereit.

Es wurde ein geschlossenes Laufsystem verwendet (vgl. Abb. 16). Bei einer Druck erzeugenden Höhendifferenz von 190 cm betrug der Laufmitteldurchsatz etwa 1,5 ml/min.

Nach dem Aufbringen der Proben wurden die ersten 100 ml des Eluates in einem Fraktionssammler in 4 ml Fraktionen gesammelt.

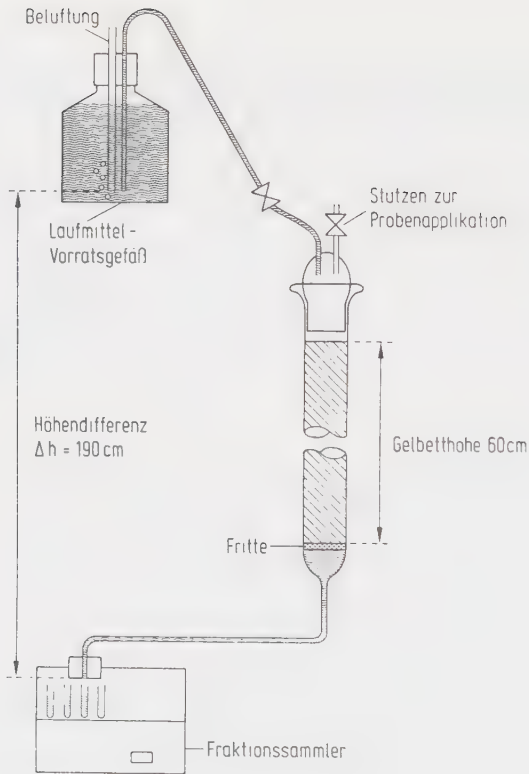


Abb. 16: Schema der Chromatographieanlage

4.6.4.2 Lokalisation und Bestimmung der Recovery

Die ersten 40 ml wurden verworfen. Zur Bestimmung der Recovery von Extraktion und Chromatographie wurden von den folgenden 4 ml-Fractionen jeweils 800 μ l in Szintillationsgefäße abpipettiert. Dieses Volumen wurde in einem mit einer Wasserstrahlpumpe betriebenen, auf 40° C beheizten Exsiccator abgedampft. Anschließend wurden 200 μ l C-Puffer und 10 ml Szintillationsflüssigkeit in die Szintillationsgefäße

pipettiert und die Proben zur Lokalisation der radioaktiven Steroide je eine Minute um β -Zähler (Fa. Beckman, Modell LS 8100) gezählt. Der Peak der Radioaktivität erstreckte sich i.a. für jedes Hormon über 3 Fraktionen entsprechend 12 ml Eluatvolumen (vgl. Abb. 17). Zur genauen Bestimmung der Aktivität wurden diese Fraktionen anschließend 30 Minuten lang gezählt.

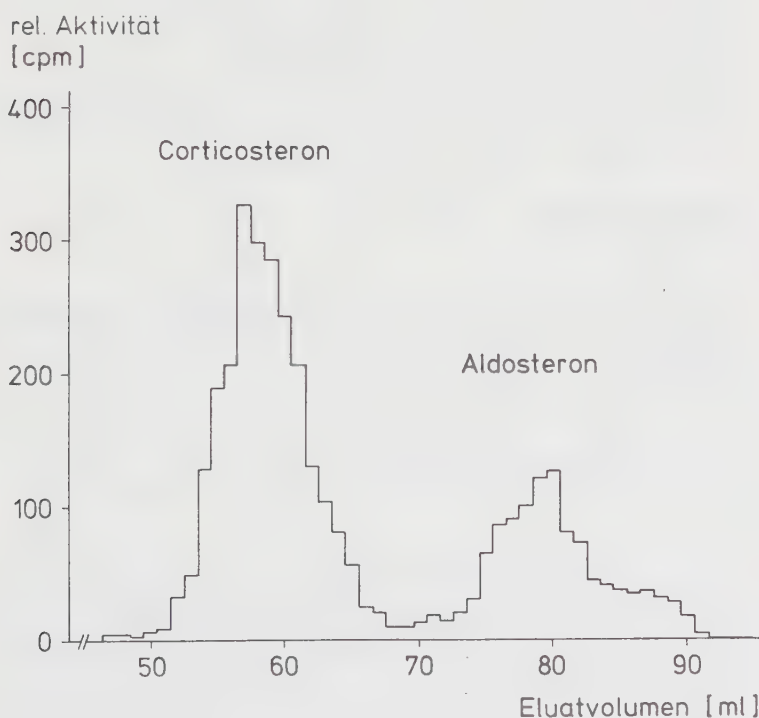


Abb. 17: Lokalisation von Corticosteron und Aldosteron im Säuleneluat (Plasmaeinsatz: 750 μ l, Volumen je Fraktion: 1 ml).

Die Recovery wurde folgendermaßen berechnet:

$$\frac{\text{Aktivität des 100\% Recovery-Ansatzes}}{\text{Aktivitätssumme der Peakfraktionen} \cdot 5} = \text{Recovery (\%)}$$

4.6.4.3 Bearbeitung der hormonhaltigen Fraktionen

Die nach dem Abpipettieren der 800 μ l für die Recoverybestimmung verbliebenen 3200 μ l Eluat der entsprechenden Peakfraktionen wurden zusammengeschüttet und bei 37° C im Wasserbad unter nachgereinigtem Stickstoff abgedampft. Die Proben wurden anschließend in 1 ml Äthanol gelöst und bei 4° C für den späteren Radioimmunoassay aufbewahrt.

Am Tag vor dem Radioimmunoassay wurden diese Proben nochmals abgedampft und die Aldosteronproben in 1600 μ l, die Corticosteronproben in 8000 μ l Äthanol gelöst.

4.6.5 Radioimmunoassay

4.6.5.1 Eichreihen

Aufgrund der beim Aufbau der Bestimmungsmethode gesammelten Erfahrungen wurden für die Eichreihen folgende äthanolische Lösungen der - nicht radioaktiv markierten - Hormone ange-
setzt:

a) Corticosteron: (pg/ml)

500, 1000, 2000, 4000, 8000, 16.000;

b) Aldosteron: (pg/ml)

125, 250, 500, 1000, 2000, 4000.

Um Verdunstungsverluste herabzusetzen, wurden die Eichlösungen in verschlossenen Glasfläschchen bei - 40° C aufbewahrt und vor einem RIA über Nacht auf Zimmertemperatur erwärmt.

Jeder Wert der Eichreihen wurde zweimal bestimmt. Außerdem wurden vier Leerwerte mitgeführt.

Jeweils 100 μ l der Eichreihenlösungen wurden mit Konstruktionspipetten in 1,5 ml fassende Kunststoffröhrchen pipet-

tiert und im Exsiccator bei 40° C abgedampft.

Die anschließende Bearbeitung der Eichreihen entsprach derjenigen der Probenbehandlung.

4.6.5.2 Teilung der Proben

Von den 1600 µl der Aldosteronproben (vgl. Kapitel 4.6.4.3) wurden zur Doppelbestimmung je zweimal 750 µl in 1,5 ml fassende Kunststoffröhrchen pipettiert.

Von den Corticosteronproben, die ein Volumen von 8000 µl hatten (vgl. Kapitel 4.6.4.3), wurden jeweils nur 50 µl in Duplikaten in die Röhrchen abpipettiert. Dieses geringe Probenvolumen erwies sich als RIA-Einsatz aufgrund der Vorversuche als sinnvoll. Die Probenwerte liegen dabei im günstigsten Bereich der Eichkurve.

Sämtliche RIA-Proben wurden dann im Exsiccator bei 40° C abgedampft.

4.6.5.3 Radioaktiv markierte Steroide

Für jeden RIA wurden Lösungen der radioaktiv markierten Steroide Aldosteron und Corticosteron in C-Puffer mit einer spezifischen Aktivität von 100.000 cpm/ml angesetzt.

Jeweils 100 µl der entsprechenden Lösung wurden in die Vials des Leerwertes, der Eichreihen und der Proben pipettiert.

4.6.5.4 Antikörper

Die Antikörper (vgl. Kapitel 4.6.1) wurden liopylisiert geliefert und bei Bedarf in 500 µl aqua dest. gelöst. Mittels einer Verdünnungsreihe mit C-Puffer wurde der Titer so bestimmt, daß 50% der in einem Test-RIA angebotenen markierten Steroide an den Antikörper gebunden wurden. Der Titer des Corticosteron-Antikörpers betrug 1 : 12.000, der des Aldosteron-Antikörpers 1 : 25.000.

Jeweils 500 μl der entsprechenden Antikörperlösung wurde nun zu den je 100 μl radioaktiv markierten Steroiden pipettiert. Anschließend wurden die Proben vorsichtig gevortext.

4.6.5.5 Dextran-Kohle-Suspension

Die Dextran-Kohle-Suspension diente zur Trennung des Antigen-Antikörper-Komplexes vom freien Hormon, das nach seiner Adsorption an die Dextran-beschichtete Kohle abzentrifugiert wird.

Die Inkubation der Röhrchen erfolgte 20 Minuten bei 37°C im Schüttelbad und weitere 2 Stunden im Wasserbad bei 4°C . Danach wurden 100 μl der Dextran-Kohle-Suspension (vgl. Kapitel 4.6.1) zu den Eichreihen- und Plasmaproben pipettiert.

Zu den Standardproben wurden anstatt der Dextran-Kohle-Suspension 100 μl C-Puffer pipettiert.

Nach dem anschließenden Vortexen wurden alle Röhrchen 15 Minuten bei 4°C inkubiert und danach 15 Minuten mit 2700 ms^{-2} zentrifugiert.

4.6.5.6 Dekantieren

Vor dem Dekantieren des Überstandes, der den Antigen-Antikörper-Komplex enthält, wurde eine entsprechende Zahl Szintillationsfläschchen mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit gefüllt.

Der Überstand, der sich durch das Zentrifugieren gebildet hatte, wurde nun von Hand in die Szintillationsfläschchen dekantiert und nach dem Verschließen gut geschüttelt.

Nach 2 Stunden wurde die Radioaktivität aller Fläschchen 15 Minuten lang im Zähler gemessen.

4.6.5.7 Auswertung des Radioimmunoassays

Die Hormonkonzentration im Plasma K wurde nach folgender Formel berechnet:

$$K = \frac{T}{R} \cdot \frac{E}{P}; \quad [\text{pg/ml}]$$

T = Teilungsfaktor [-]

E = Hormonmenge des RIA-Einsatzes [pg]

R = Recovery

P = eingesetztes Plasmavolumen [ml]

Beim Corticosteron betrug der Teilungsfaktor T 200, da von 10 ml Probenvolumen (8 ml + 2 ml zur Recoverybestimmung) im RIA jeweils 50 µl eingesetzt wurden.

Für Aldosteron betrug T 2.667, da von 1600 µl + 400 µl zur Recoverybestimmung jeweils 750 µl im RIA verwendet wurden.

Die Hormonmenge E wurde aus der Eichkurve bestimmt (vgl. Abb. 18).

Die Recovery R bezeichnet den Anteil der Hormone, der nach Extraktion und Chromatographie noch gefunden wurde.

Das eingesetzte Plasmavolumen betrug 0,750 ml.

Damit ergab sich

a) für Corticosteron: $K = \frac{26.67}{R} \frac{E}{\%} \text{ pg}; \quad [\text{ng/ml}]$

b) für Aldosteron: $K = \frac{35.55}{R} \frac{E}{\%} \text{ pg}; \quad [\text{ng/ml}]$

4.7

Statistische Auswertung

Die Angabe der Mittelwerte $\bar{x}$ erfolgte $\pm$ der Standardabweichung SD:

$$\bar{x} \pm \text{SD.}$$

Die Vergleiche der Hormonkonzentrationen zwischen den Nikotin-behandelten bzw. berauchten Tieren und den Kontrolltieren erfolgten mit Student's t-Test für unverbundene Stichproben, wobei als Signifikanzschwelle $p < 0,05$ festgelegt war.

Bei der Untersuchung der zeitlichen Verläufe der Körpergewichte wurde eine partiell hierarchische Varianzanalyse verwendet (vgl. Dixon, 1977) mit den Faktoren:

Bezeichnung des Versuchstieres, Behandlungsform, Messwiederholung (wöchentliche Gewichtsmessung).

Bei den Versuchen über die Nikotinwirkung auf den Körpergewichtsverlauf war die Gruppenvariable die Kontrollbehandlung bzw. die Nikotinzufuhr. Bei der Untersuchung der Dexamethasonwirkung auf das Körpergewicht war die Gruppenvariable entsprechend die Kontrollbehandlung bzw. die Dexamethasongabe. Die einzelnen Versuchstiere wurden als Randomfaktoren angesehen und der entsprechenden Behandlungsform hierarchisch untergeordnet.

An dieser Stelle sei Herrn Prof.Dr. K. Überla, dem Vorstand des Instituts für Medizinische Informationsverarbeitung, Statistik und Biomathematik dafür gedankt, daß für die partiell hierarchische Varianzanalyse das Programm BMDP 2 V (vgl. Dixon, 1977) auf der Rechenanlage des Klinikums Großhadern benutzt werden konnte.

5. ERGEBNISSE

5.1 Hormonbestimmung

5.1.1 Recovery

Die Recovery der internen radioaktiven Standards betrug nach Extraktion und Chromatographie für

- a) Corticosteron: $61,4 \pm 8,8\%$
- b) Aldosteron: $48,7 \pm 7,6\%$.

Hormonbestimmungen, bei denen die Recovery bei Corticosteron kleiner als 40% und/oder bei Aldosteron kleiner als 30% war, wurden grundsätzlich nicht berücksichtigt.

5.1.2 Empfindlichkeit

Zur Bestimmung der unteren Nachweisgrenze wurden Hormonbestimmungen mit Proben durchgeführt, die anstatt aus hormongehaltigem Plasma aus 750 μ l aqua dest. bestanden (sog. Leerproben).

Die untere Nachweisgrenze wurde definiert als:

Mittelwert der Leerprobe + 2 · Standardabweichung
und betrug für

- a) Corticosteron: 1,1 ng/ml
- b) Aldosteron: 20,4 pg/ml.

5.1.3 Spezifität

Die Spezifität radioimmunologischer Messungen wird dadurch eingeschränkt, daß Antikörper nicht nur Verbindung mit dem zu bestimmenden Antigen eingehen, sondern auch mit Molekülen, die eine dem Antigen ähnliche Struktur aufweisen (Kreuzreaktionen).

Diesem Problem muß gerade bei der radioimmunologischen Bestimmung des Aldosterons besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden, da die Plasmakonzentrationen anderer Corticosteroide,

die unspezifische Immunreaktionen verursachen können, in wesentlich höheren Konzentrationen als das Aldosteron vorliegen. So liegt bei Ratten die Plasmakonzentration des Corticosterons etwa um den Faktor 10^3 höher als die des Aldosterons.

Die Spezifität der Antikörper wird durch die sog. Kreuzreaktionen gekennzeichnet (vgl. Abraham, 1969). Die bei unseren Versuchen verwendeten Aldosteron-Antikörper weisen folgende Kreuzreaktionen auf (vgl. Vecsei, 1975):

Aldosteron	100%
Corticosteron	0,28%
Progesteron	0,10%
Cortisol	0,80%
Cortison	0,20%
18-OH-Corticosteron	0,004%
18-OH-Desoxycorticosteron	0,12%
11-OH-Progesteron	0,26%
17-OH-Progesteron	0,023%
Testosteron	0,012%.

5.1.4 Präzision

Zur Bestimmung der Präzision wurden in jedem RIA die Steroidkonzentrationen mehrerer Proben desselben Plasmas bestimmt. Es ergab sich dabei für

- a) Corticosteron: Mittelwert 242 ng/ml
Standardabweichung 27 ng/ml
Variationskoeffizient 11,2%
- b) für Aldosteron: Mittelwert 507 pg/ml
Standardabweichung 54 pg/ml
Variationskoeffizient 10,7%.

5.1.5 Steroidkonzentrationen unter Normalbedingungen und nach Dexamethasongaben

Die durchschnittlichen Plasmawerte betrugen bei Ratten unter Normalbedingungen (Standarddiät) zwischen 14.00 und 15.00

Uhr (Käfiggruppe):

- a) Corticosteron 167 ± 48 pg/ml
- b) Aldosteron 435 ± 101 ng/ml.

Nach mehrwöchiger Dexamethasonbehandlung war bei Ratten unter Standarddiät um 14.00 Uhr die Corticosteron-Plasmakonzentration stets kleiner als 5 ng/ml. Der Aldosteronwert betrug in diesem Fall 347 ± 57 pg/ml.

5.1.6 Bindungskapazität

Die Bindungskapazität der Antikörper ergab sich aus:

$$\frac{\text{mittl. spez. Aktivität der Leerproben}}{\text{mittl. spez. Aktivität der Standardproben}}$$

Die Bindungskapazität lag bei den durchgeführten RIAs bei folgenden Werten:

- Corticosteron: $48,0 \pm 4,7\%$
- Aldosteron: $48,5 \pm 7,0\%$.

5.1.7 Eichkurve

Abb. 18 zeigt eine typische Eichkurve für Aldosteron. Mit ansteigender Steroidmenge fällt die spezifische Aktivität entsprechend der dargestellten Kurve ab.

5.2 Versuche mit normaler ACTH-Sekretion

5.2.1 Berauchungsversuche

5.2.1.1 Kurzversuch über 30 Stunden mit Berauchung

Dieser Berauchungsversuch erfolgte mit intensiver Berauchung über 30 Stunden mit 5 Zigaretten je Ratte und Stunde (insgesamt 150 Zigaretten je Tier). Bei diesem Versuch wurde das Blut zur Hormonbestimmung unmittelbar nach Beendigung der

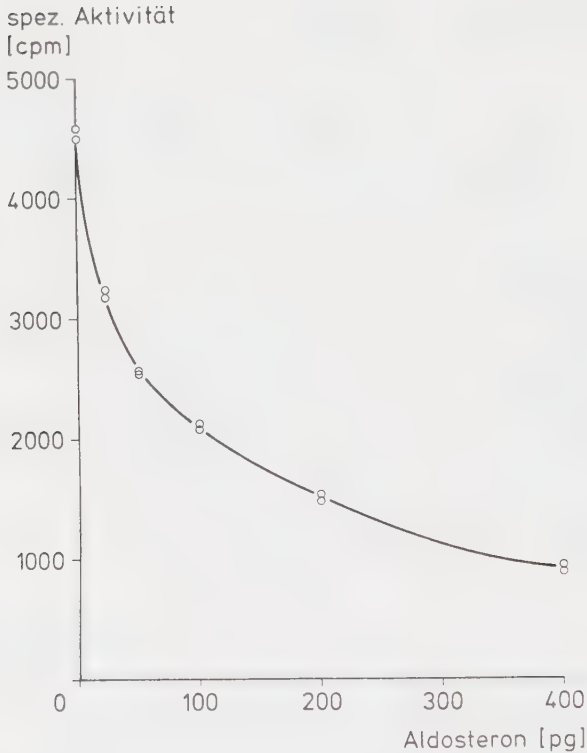


Abb. 18: Eichkurve für Aldosteron (Bindungskapazität 46%).

Rauchphase gewonnen.

Abb. 19 zeigt die Hormonkonzentrationen der Maschinengruppe im Vergleich zur Rauchgruppe. Die Corticosteron-Plasmakonzentration der Maschinengruppe lag bei 250 ± 46 ng/ml. Durch die Berauchung stieg dieser Wert signifikant auf 492 ± 111 ng/ml ($p < 0,001$).

KURZZEITVERSUCHE ÜBER 30 STUNDEN MIT BERAUCHUNG

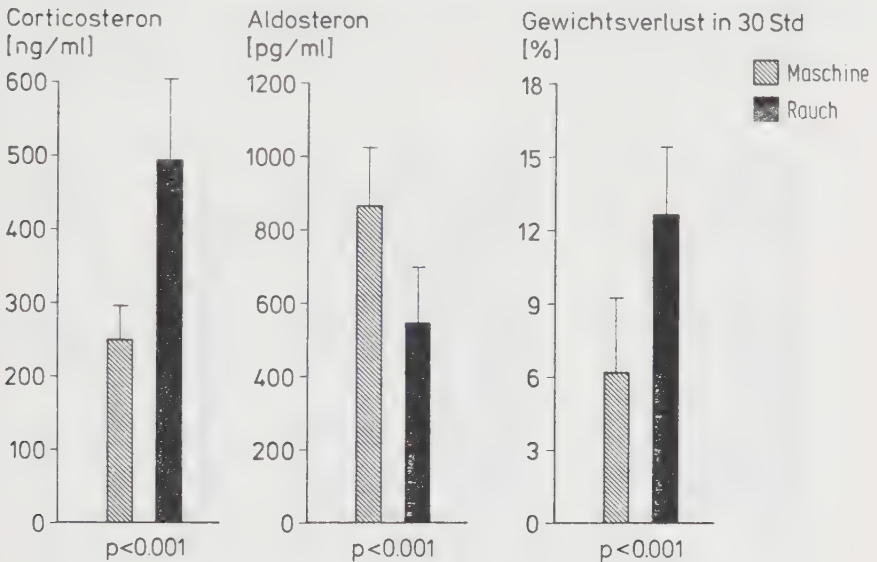


Abb. 19: Plasmakonzentrationen von Corticosteron und Aldosteron und Gewichtsverlust nach einem Kurzzeitversuch mit 30-stündiger Berauchung.

Im Gegensatz zu diesem Anstieg des Corticosterons fiel die Plasmakonzentration des Aldosterons bei Berauchung von 865 ± 163 pg/ml (Maschinengruppe) signifikant auf 548 ± 156 pg/ml ($p < 0,001$).

Der Gewichtsverlust während des 30-stündigen Versuchs betrug bei der Maschinengruppe $6,2 \pm 3,1\%$ und war damit nur etwa halb so groß wie bei den berauchten Tieren ($12,7 \pm 2,8\%$).

5.2.1.2 Mehrwöchige Versuche mit Berauchung

Wie in Kapitel 4.2 geschildert, erfolgte zu Beginn der Langzeitversuche mit Berauchung eine einwöchige Gewöhnungsphase, während der die Maschinen- und Rauchgruppen jeweils ohne Rauchbelastung an die Bedingungen in den Rauchmaschinen gewöhnt wurden.

Die tägliche Zigarettendosierung stieg bei den Rauchgruppen danach von 4 Zigaretten pro Ratte und Tag nach zwei Wochen auf das Doppelte und nach weiteren zwei Wochen auf 15 Zigaretten pro Ratte und Tag.

Um die unmittelbaren Einflüsse der Versuchsbedingungen auf die Steroid-Plasmaspiegel auszuschalten, fand die Blutentnahme hier - wie bei allen folgenden Versuchen - erst 3 1/2 Stunden nach der letzten Berauchung statt.

Abb. 20 zeigt die Ergebnisse dieser Versuchsserie. Sie weichen entscheidend von denen des Kurzzeitversuches ab.

Die Plasmakonzentrationen des Corticosterons betrugen in der Käfiggruppe 167 ± 48 ng/ml und bei der Maschinengruppe 152 ± 57 ng/ml. Die Corticosteron-Plasmakonzentration der Rauchgruppe betrug 165 ± 59 ng/ml und unterschied sich nicht von den Kontrollen.

Bei den Plasma-Aldosteronwerten war ebenfalls keine Wirkung der Berauchung festzustellen (Käfiggruppe: 435 ± 101 pg/ml, Maschinengruppe: 373 ± 84 pg/ml, Rauchgruppe: 395 ± 72 pg/ml).

Außerdem waren sowohl die Gewichtsentwicklung der Tiere während der 8-wöchigen Versuchsdauer als auch die im rechten Teil der Abb. 20 aufgeführten Körpergewichte bei Versuchsende vergleichbar (Käfiggruppe: 404 ± 30 g, Maschinengruppe: 394 ± 21 g, Rauchgruppe: 390 ± 38 g).

5.2.2 Mehrwöchige Versuche mit s.c. Nikotingaben

Die Versuche mit subcutanen Nikotininjektionen erfolgten ebenfalls über 8 Wochen.

LANGZEITVERSUCHE ÜBER 8 WOCHEN MIT BERAUCHUNG

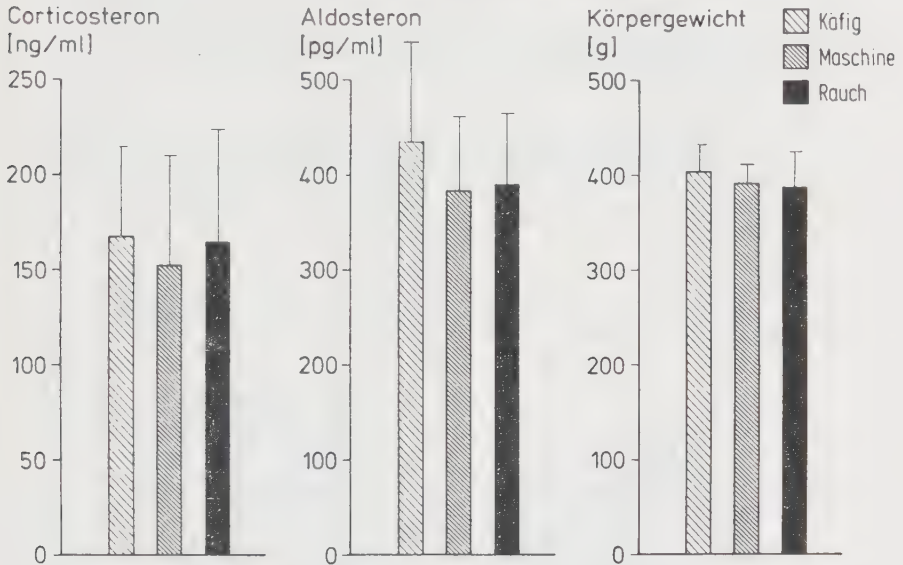


Abb. 20: Plasmakonzentrationen von Corticosteron und Aldosteron und Körpergewicht nach einem Langzeitversuch über 8 Wochen mit Berauchung.

5.2.2.1 Nikotin gelöst in physiologischer Kochsalzlösung

In dieser Versuchsreihe wurde nach einer einwöchigen Gewöhnungsphase zweimal täglich 0,5 mg/kg KG Nikotin gelöst in 0,9%iger NaCl-Lösung s.c. appliziert.

Die Kontrollgruppe erhielt nur physiologische Kochsalzlösung in einer Menge von 1 ml/kg KG zweimal täglich s.c.

Aus Abb. 21 (helle Schraffuren) geht hervor, daß beim Corticosteron - wie bei den Langzeitversuchen mit Berauchung -

LANGZEITVERSUCHE ÜBER 8 WOCHEN MIT SUBCUTANEN NIKOTINGABEN

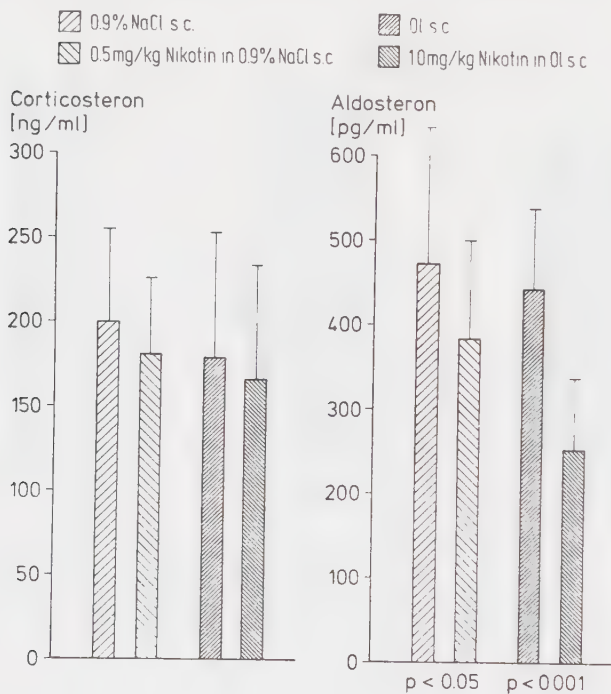


Abb. 21: Plasmakonzentrationen von Corticosteron und Aldosteron nach einem Langzeitversuch über 8 Wochen mit subcutanen Nikotingaben.

keine signifikanten Änderungen auftragen (Kontrolle: 200 ± 55 ng/ml, Nikotin: 182 ± 45 ng/ml).

Der Aldosteronspiegel war jedoch bei Nikotingabe signifikant um 19% vermindert (Kontrolle: 473 ± 186 pg/ml, Nikotin: 383 ± 117 pg/ml, $p < 0,05$).

Die Zunahme des Körpergewichtes war bei den Tieren, die Nikotin erhielten, signifikant ($p < 0,01$) vermindert (vgl. Abb. 22, runde Symbole).

LANGZEITVERSUCHE ÜBER 8 WOCHEN MIT SUBCUTANEN NIKOTINGABEN

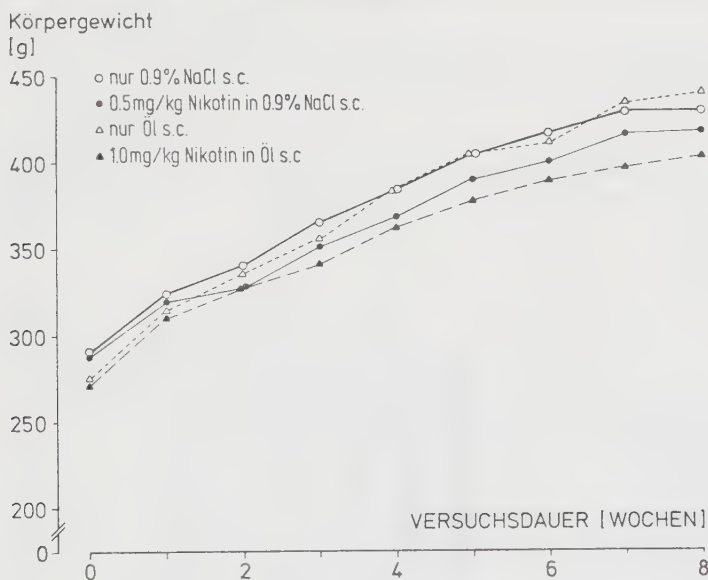


Abb. 22: Körpergewichtsverlauf während eines Langzeitversuches über 8 Wochen mit subcutanen Nikotingaben.

Die Körpergewichte bei Versuchsende betrugen bei den Kontrolltieren 430 ± 21 g und bei den Nikotin-behandelten Tieren 413 ± 19 g.

5.2.2.2 Nikotin gelöst in Olivenöl

Bei diesen Versuchen mit Nikotin, das in Olivenöl gelöst war, lag die Nikotindosierung mit $1,0$ mg/kg KG zweimal täglich subcutan doppelt so hoch wie bei den zuvor aufgeführten Versuchen.

Die Kontrollgruppen erhielten zweimal täglich $0,5$ ml/kg KG Olivenöl s.c.

Wie bei allen bisherigen Langzeitversuchen trat auch hier (vgl. Abb. 21, dunkle Schraffuren) keine Beeinflussung des Corticosteron-Plasmaspiegels durch Nikotingabe ein (Kontrolle: 179 ± 79 ng/ml, Nikotin: 166 ± 67 ng/ml).

Wie bei dem Versuch mit Nikotin gelöst in physiologischer Kochsalzlösung trat auch hier ein signifikanter Abfall des Aldosteron-Plasmaspiegels auf. Der Abfall war sogar mit 43% noch stärker ausgeprägt (Kontrolle: 442 ± 118 pg/ml, Nikotin: 253 ± 99 pg/ml, $p < 0,001$).

In der Entwicklung des Körpergewichtes (vgl. Abb. 22, dreieckige Symbole) trat bei den Nikotin-behandelten Tieren eine signifikante Verzögerung ($p < 0,01$) auf. Bei Versuchsende betrug das Körpergewicht der Kontrolltiere 440 ± 24 g, und das der Tiere, die Nikotin erhielten, 404 ± 24 g.

5.3 Versuche mit ACTH-Suppression durch Dexamethason

Aufbau und Nikotindosierungen dieser Versuche entsprachen den vergleichbaren Versuchen ohne Dexamethasongabe.

Zur ACTH-Unterdrückung erhielten die Ratten wöchentlich zwei subcutane Injektionen von Dexamethason-21-dinatrium-phosphat. Die ersten drei Injektionen hatten eine Dosierung von 1 mg/kg KG, danach wurde die Dosierung auf die Hälfte reduziert (vgl. Kapitel 4.4).

5.3.1 Mehrwöchige Versuche mit Berauchung

Die Ergebnisse dieser Versuchsserie sind in Abb. 23 dargestellt. Die Corticosteron-Plasmakonzentrationen lagen bei allen Versuchstieren unter 5 ng/ml und wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.

Der Aldosteronspiegel bei den Ratten der Rauchgruppe (326 ± 48 pg/ml) war gegenüber dem der beiden Kontrollgruppen (Käfiggruppe: 347 ± 57 pg/ml, Maschinengruppe: 338 ± 68 pg/ml) nicht signifikant vermindert.

Ebenso waren die Körpergewichte bei Versuchsende vergleichbar (Käfiggruppe: 281 ± 15 g, Maschinengruppe: 288 ± 21 g, Rauchgruppe: 294 ± 23 g).

LANGZEITVERSUCHE ÜBER 8 WOCHEN UNTER DEXAMETHASON MIT BERAUCHUNG

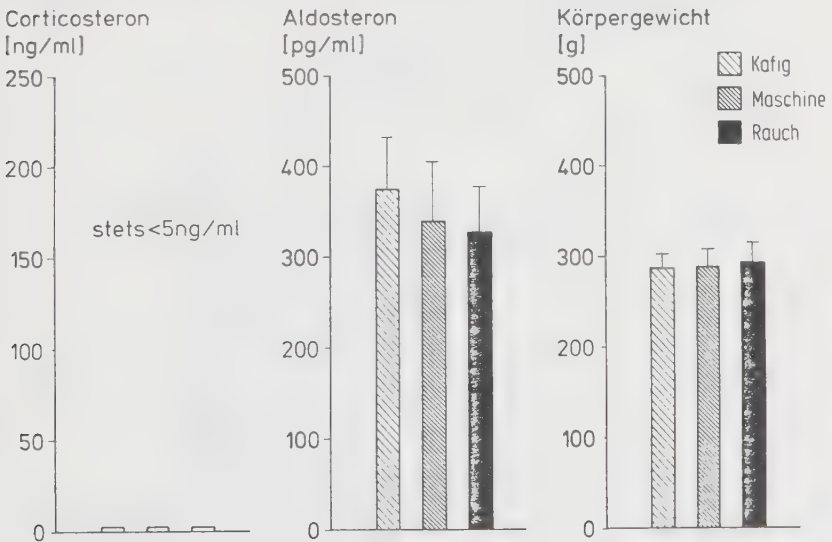


Abb. 23: Plasmakonzentrationen von Corticosteron und Aldosteron und Körpergewicht nach einem Langzeitversuch über 8 Wochen unter Dexamethason mit Berauchung.

5.3.2 Mehrwöchige Versuche mit s.c. Nikotingaben

5.3.2.1 Nikotin gelöst in physiologischer Kochsalzlösung

Die Ergebnisse sind in Abb. 24 (helle Schraffuren) dargestellt. Die Corticosteron-Plasmakonzentrationen waren bei allen Tieren stets kleiner als 5 ng/ml und wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.

LANGZEITVERSUCHE ÜBER 8 WOCHEN UNTER DEXAMETHASON MIT SUBCUTANEN NIKOTINGABEN

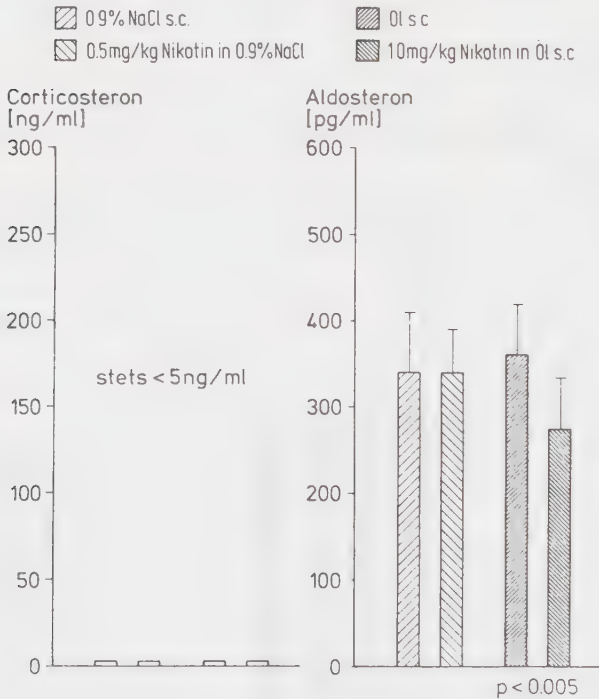


Abb. 24: Plasmakonzentrationen von Corticosteron und Aldosteron nach einem Langzeitversuch mit subcutanen Nikotingaben unter Dexamethason.

Bei diesem Versuch unterschieden sich die Aldosteronspiegel der Tiere, die physiologische Kochsalzlösung erhielten, und derjenigen, die zusätzlich Nikotin erhielten, nicht (Kontrolle: 341 ± 67 pg/ml, Nikotin: 340 ± 45 pg/ml).

Die Entwicklung des Körpergewichtes ist mit runden Symbolen in Abb. 25 dargestellt. Die Verläufe unterschieden sich nicht signifikant. Bei Versuchsende betrugen die Körpergewichte der Kontrolle 287 ± 19 g und der Nikotin-behandelten Tiere 288 ± 12 g.

LANGZEITVERSUCHE ÜBER 8 WOCHEN UNTER DEXAMETHASON MIT SUBCUTANEN NIKOTINGABEN

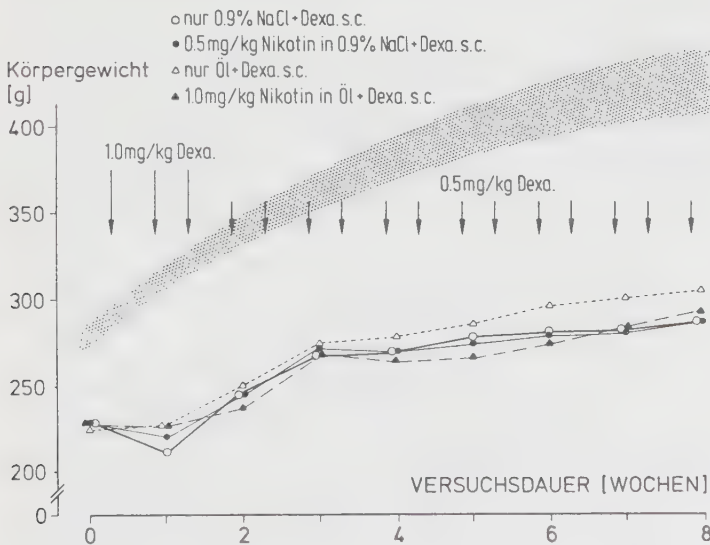


Abb. 25: Körpergewichtsverlauf während eines Langzeitversuchs über 8 Wochen mit subcutanen Nikotiningaben unter Dexamethason (graues Raster: entsprechende Versuche ohne Dexamethason).

Aus Abb. 25 geht auch sehr anschaulich der Unterschied in der Gewichtsentwicklung der Dexamethason-behandelten Tiere im Vergleich zu den unbehandelten (graues Raster) hervor.

5.3.2.2 Nikotin gelöst in Olivenöl

Wie bei allen anderen Versuchen unter Dexamethason war auch hier der Corticosteronspiegel so niedrig, daß keine Unterschiede zwischen Kontrolle und Nikotingabe festgestellt werden konnten (vgl. Abb. 24, dunkle Schraffuren).

Im Gegensatz zu dem vorangegangenen Versuch mit Nikotin gelöst in physiologischer Kochsalzlösung zeigte sich bei der hier verwendeten höheren Dosierung von Nikotin (1 mg/kg KG) ein signifikanter Abfall in der Konzentration des Plasma-Aldosterons gegenüber den Kontrollen: Er betrug 24%, $p < 0,005$. Der Aldosteronspiegel der Kontrolle lag bei 361 ± 54 pg/ml, nach den Nikotingaben sank er auf 274 ± 60 pg/ml.

Wie aus Abb. 25 (dreieckige Symbole) hervorgeht, trat ab der 4. Versuchswoche ein Unterschied bei der Gewichtsentwicklung auf. Mit $p < 0,01$ war er signifikant. Die Körpergewichte bei Versuchsende betrugen bei den Kontrollen 304 ± 24 g und bei den Tieren, die Nikotin erhielten, 293 ± 35 g.

6. DISKUSSION

6.1 Normalwerte

Die bei den Versuchen unter Normalbedingungen (Käfiggruppen, Standarddiät, Blutentnahme zwischen 14.00 und 15.00 Uhr) gemessenen Plasmakonzentrationen von Aldosteron und Corticosteron stimmen mit den Angaben in der Literatur gut überein (Campbell et al., 1974; Balfour et al., 1975a, 1975b; Turner, 1975; Hilfenhaus, 1976, 1977a, 1977b).

6.2 Kurzzeitversuch

Die Ergebnisse des Kurzzeitversuchs (vgl. Abb. 20) zeigen eine Verdoppelung des Plasma-Corticosteron-Wertes unmittelbar nach intensiver Berauchung. Dieser Anstieg des mengenmäßig bedeutendsten Glucocorticoids der Ratte steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Turner (1975), Kershbaum et al. (1967a, 1967b, 1968), Suzuki et al. (1973), Balfour et al. (1975a). Diese Autoren fanden bei Ratten und anderen Spezies ebenfalls einen signifikanten Anstieg der Glucocorticoide im Plasma unmittelbar nach der parenteralen Gabe von Nikotin.

Es ist allerdings nicht ausgeschlossen, daß bei dem durchgeführten Kurzzeitversuch eine zusätzliche, Stress-induzierte Erhöhung der Plasma-Corticoide durch die ungewohnte Umgebung (Lärm der Rauchmaschinen, Rauchgehalt der Luft bedeutet Gefahrensignal für Tiere) auftrat. Für diese Vermutung sprechen sowohl die beobachtete Unruhe der Tiere als auch der beträchtliche Gewichtsverlust bei den Kontrolltieren während der 30-stündigen Versuchsdauer.

Nach den Ergebnissen von Fuller et al. (1977) ist die akute Wirkung von Stress auf die Glucocorticoid-Plasmakonzentration bei Ratten spätestens nach zwei Stunden abgeklungen, während die Nikotinwirkung auf diesen Parameter bereits

nach einer Stunde nicht mehr nachgewiesen werden kann (Balfour et al., 1975b).

Diese mögliche Verfälschung der Versuchsergebnisse durch akute Nikotin- oder Stresseinflüsse war Anlaß, die Blutentnahme bei den Langzeitversuchen frühestens 3 1/2 Stunden nach der letzten Berauchung bzw. Nikotingabe durchzuführen.

Äußerst interessant sind aber die sich bereits hier abzeichnenden Aldosteron-Befunde. Trotz des starken ACTH-Anstieges, der sich in der Erhöhung des Plasma-Corticosterons zeigt, trat eine signifikante Verminderung der Plasma-Aldosteron-Konzentration auf (Maschinengruppe: 865 ± 163 pg/ml; Rauchgruppe: 548 ± 156 pg/ml, $p < 0,001$).

6.3 Langzeitversuche mit normaler ACTH-Sekretion

Die Ergebnisse der durchgeführten Langzeitversuche lassen erkennen, daß weder langfristige Berauchung noch subcutane Applikation von Nikotin in verschiedenen Lösungsmitteln die Corticosteron-Plasmakonzentration bei Ratten anhaltend beeinflusst.

Da der Schwerpunkt der vorliegenden Untersuchungen auf den chronischen Wirkungen von Nikotin lag, wurde die Blutentnahme bei den Versuchen erst 3 1/2 Stunden nach der letzten Berauchung bzw. s.c. Nikotingabe vorgenommen.

Unter diesen Bedingungen besteht ein Zusammenhang zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und den Untersuchungen von Balfour et al. (1975b), in denen bereits eine Stunde nach einer einmaligen s.c. Injektion von Nikotin keine Erhöhung der Glucocorticoide im Plasma mehr festgestellt werden konnte.

Dieses Ergebnis der vorliegenden Arbeit kann auch mit einer klinischen Studie von Tucci et al. (1972) in Zusammenhang gebracht werden, die - abgesehen von akuten Wirkungen nach

Zigarettenrauchinhalation - keine Unterschiede im Plasma-Cortisolspiegel von Gewohnheitsrauchern und Nichtraucher finden konnten.

Bei allen Langzeitversuchen mit Berauchung konnten in der Aldosteron-Plasmakonzentration ebenfalls keine anhaltenden Unterschiede zwischen den beiden Kontrollgruppen und den berauchten Tieren festgestellt werden.

Im Gegensatz dazu traten bei allen Versuchen mit subcutanen Nikotingaben und ansonsten unbeeinflusster ACTH-Freisetzung signifikante Verminderungen in der Plasma-Aldosteronkonzentration auf. Bei den Versuchen mit Nikotin in physiologischer Kochsalzlösung (Dosierung: 0,5 mg/kg KG zweimal täglich s.c.) war dieser Parameter bei den Tieren, die Nikotin erhielten, gegenüber den Kontrollen im Durchschnitt um 19% ($p < 0,05$) vermindert. Bei den Versuchen mit Nikotin gelöst in Olivenöl war die Dosierung doppelt so hoch, und der Unterschied betrug hier sogar 43% ($p < 0,001$).

Diese Befunde, die eine geringere Aldosteronkonzentration im Plasma nach subcutaner Nikotingabe zeigten, stehen in Übereinstimmung mit der einzigen Arbeit, die bisher über Zusammenhänge zwischen Nikotin bzw. Zigarettenrauch und Aldosteron vorlag. In seiner Arbeit beschrieb Hökfelt (1961) einen Abfall der Aldosteronausscheidung im Urin um ca. 50% bei gewohnheitsmäßigen Nichtrauchern, die zwei filterlose Zigaretten inhaliert hatten (vgl. Tabelle 1).

Da nach den Ergebnissen von Stolecke (1972) und Hilfenhaus (1977b) gezeigt wurde, daß sich die Aldosteronausscheidung im Urin proportional zur Aldosteron-Plasmakonzentration verhält, kann somit sogar ein direkter Zusammenhang zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und den Untersuchungen von Hökfelt gesehen werden.

6.4 Langzeitversuche mit ACTH-Suppression durch Dexamethason

Bereits sehr geringe Mengen des hochwirksamen synthetischen Glucocorticoids Dexamethason hemmen bekanntlich kompetitiv die endogene ACTH-Synthese. Diese Wirkung zeigt sich in einem deutlichen Abfall der Glucocorticoid-Konzentrationen im Plasma (Engelhardt, 1963; Martini et al., 1966; Sirett et al., 1969; Feldmann et al., 1973; Espiner et al., 1978).

Nachdem die großen Probleme bei der radioimmunologischen Bestimmung der ACTH-Plasmakonzentration überwunden sind (Copinisch et al., 1975; Müller et al., 1978), ist es auch möglich geworden, die Verminderung der ACTH-Konzentration im Plasma direkt nachzuweisen (Copinisch et al., 1975).

Bei den durchgeführten Versuchen mit mehrwöchigen Dexamethasongaben zeigt sich die erfolgreiche Unterdrückung der ACTH-Ausschüttung daran, daß die Corticosteron-Plasmakonzentration stets weniger als 5 ng/ml betrug (Normalwert der Käfiggruppe ohne Dexamethason: 167 ± 48 ng/ml). Unterschiede zwischen den Tieren, die Nikotin erhielten und den Kontrollen waren nicht feststellbar (vgl. Abb. 23 und 24).

Die Aldosteron-Plasmakonzentration bei den Tieren der Käfiggruppe nach Dexamethasongaben (347 ± 57 pg/ml) war im Vergleich zur derjenigen der Käfiggruppe ohne Dexamethasongaben (435 ± 101 pg/ml) signifikant vermindert ($p \leq 0,01$). Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den Arbeiten von Holzbauer (1964), Blair-West (1976), Ganguly et al. (1977), Hilfenhaus (1974), Espiner (1978) und kann als Hinweis auf die Beeinflussung des Aldosterons durch ACTH aufgefaßt werden.

Der Einfluß der Nikotingaben auf die Aldosteron-Plasmakonzentration war bei den Versuchen unter Dexamethason geringer als bei den vorausgegangenen Experimenten mit normaler ACTH-Sekretion: Bei niedriger Nikotindosierung (0,5 mg/kg KG in NaCl-Lösung) trat hier keine signifikante Änderung der Al-

dosteronkonzentration im Plasma auf.

Die Beobachtung, daß bei den Versuchen die Gewichtsentwicklung der Tiere unter Dexamethasonbehandlung verzögert wird (vgl. Abb. 25), steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Engelhardt (1963), der bei Ratten während 15-tägigen Dexamethasongaben eine dosisabhängige Beeinflussung des Körpergewichtsverlaufes beschrieb. Dieses Verhalten kann auf die eiweißkatabole Wirkung der Glucocorticoide zurückgeführt werden.

6.5 Deutung der Verminderung der Aldosteron-Plasmakonzentration

Bei den durchgeführten Untersuchungen wurde nach starker Berauchung (Kurzzeitversuch mit 150 Zigaretten pro Ratte in 30 Stunden) und nach subcutanen Nikotingaben eine Verminderung der Aldosteron-Plasmakonzentration im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet.

Bei sämtlichen durchgeführten Langzeitversuchen mit Berauchung (Dosierung: 4 bis 15 Zigaretten pro Ratte und Tag) trat die Verringerung der Aldosteronkonzentration nicht auf, da hier möglicherweise die Nikotindosierung zu gering war.

Hierbei ist es auffallend, daß nur dann eine Verringerung der Aldosteron-Plasmakonzentration gegenüber den Kontrollen beobachtet werden konnte, wenn gleichzeitig das Körpergewicht der Nikotin-behandelten Tiere gegenüber den Kontrollen verringert war. Somit könnte das verminderte Körpergewicht zumindest teilweise auf eine Verringerung des Körpernatriums und damit des Extrazellulärvolumens zurückgeführt werden. Die Ausscheidung des Natriums wurde bei den durchgeführten Versuchen allerdings nicht bestimmt.

Es ist vorstellbar, daß die beobachtete Aldosterondepression die physiologische Reaktion auf eine primäre - durch Nikotin ausgelöste - Veränderung des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens darstellt. Diese Verschiebung im Extrazellulärvolu-

men könnte durch die antidiuretische Wirkung des Nikotins verursacht worden sein, die seit den grundlegenden Versuchen von Burn et al. (1945) bekannt ist. Schon lange wurde eine hypophysäre Ursache für diese antidiuretische Wirkung des Nikotins angenommen, da sie bei Patienten mit einem hypophysären Diabetes Insipidus (Cates et al., 1951; Conte-Devolx et al., 1977) und auch bei Ratten des Stammes Brattleboro, die denselben Defekt haben (Valtin et al., 1964; Sawyer et al., 1967), nicht auftrat.

Nachdem in den letzten Jahren zuverlässige radioimmunologische Bestimmungen des Antidiuretischen Hormons (ADH) gelangen, konnte nachgewiesen werden, daß die antidiuretische Wirkung des Nikotins durch die vermehrte Ausschüttung von ADH aus dem Hypophysen-Hinterlappen verursacht wird (Husain et al., 1975; Bisset, 1975; Conte-Devolx et al., 1976; Hayward et al., 1976; Castro de Souza et al., 1977; Legros et al., 1977).

So steigt beim Menschen nach intravenöser Applikation von 1 bis 2 mg Nikotin die ADH-Plasmakonzentration innerhalb weniger Minuten um das Vierfache an (Conte-Devolx et al., 1976). Auch nach dem Rauchen von Zigaretten konnte ein signifikanter Anstieg des ADH im Blut nachgewiesen werden (Husain et al., 1975).

Eine Folge der durch Nikotingaben verstärkten Freisetzung des Antidiuretischen Hormons besteht in einer Vergrößerung des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens, die eine verringerte Aldosteronfreisetzung bewirkt.

Zur Prüfung der aufgestellten Hypothese, daß die beobachtete Aldosteronverminderung eine Volumen-regulatorische Folge der vermehrten ADH-Freisetzung ist, wird vorgeschlagen, vergleichbare Versuche mit Ratten des Stammes Brattleboro (Valtin et al., 1964) durchzuführen. Diese Ratten haben einen kongenitalen, hypophysären Diabetes Insipidus und schütten deshalb kein ADH aus.

Die aufgeführte Deutung der Versuchsergebnisse wäre bestätigt, wenn die verminderte Aldosteron-Plasmakonzentration nach Nikotingaben bei diesen Ratten nicht auftreten würde.

Aufgrund der Versuchsergebnisse scheint eine endokrinologisch bedingte Natrium-Retention - und eine dadurch mögliche Verstärkung kardiovaskulärer Erkrankungen - durch Berauchung oder direkte Nikotingaben in jedem Fall ausgeschlossen zu sein.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Zur Untersuchung der Einflüsse von Berauchung und subcutanen Nikotingaben auf adrenocorticale Funktionen bei Ratten wurden die Plasmakonzentrationen des Mineralcorticoids Aldosteron und des Glucocorticoids Corticosteron radioimmunologisch bestimmt.

1. Berauchung:

Unmittelbar nach einem Kurzzeitversuch mit massiver Berauchung der Tiere über 30 Stunden mit 5 Zigaretten pro Ratte und Stunde lag die Corticosteron-Konzentration im Vergleich zu den Kontrollen signifikant höher. Dagegen war die Plasmakonzentration des Aldosterons nach Berauchung signifikant vermindert.

In Langzeitversuchen über 8 Wochen mit einer Dosierung von durchschnittlich 7,3 Zigaretten pro Ratte und Tag konnte kein wesentlicher Unterschied der Plasmakonzentrationen der beiden Steroide im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden.

2. Nikotininjektionen:

Langzeitversuche mit subcutaner Applikation von Nikotin erfolgten ebenfalls über 8 Wochen. Bei der Gabe von 2-mal täglich 0,5 mg/kg KG Nikotin gelöst in 0,9% NaCl-Lösung zeigte sich - wie auch bei den Kurzrauchversuchen - im Vergleich zu der Kontrollgruppe, die nur 0,9% NaCl-Lösung subcutan erhielt, ein signifikanter Abfall des Plasma-Aldosteronspiegels. Die Konzentration des Corticosterons im Plasma war nur unwesentlich verändert. Die Zunahme des Körpergewichts war bei den Tieren, die Nikotin erhielten, signifikant vermindert.

Bei einem zweiten Langzeitversuch wurde Nikotin in Öl gelöst und 2-mal täglich 1 mg/kg KG Nikotin subcutan verabreicht. Die Versuchsdauer betrug ebenfalls 8 Wochen. Zum Vergleich dienten Tiere, die nur Öl subcutan

erhielten. Auch bei dieser Versuchsreihe wurde ein signifikanter Abfall des Aldosteron-Plasmaspiegels bei Nikotingabe beobachtet. Die Plasmakonzentration des Corticosterons war kaum verändert, die Gewichtsentwicklung der mit Nikotin behandelten Tiere war ebenfalls signifikant vermindert.

3. Dexamethason:

Zur Klärung, ob die Nikotin-abhängige Abnahme des Aldosteronspiegels durch ACTH moduliert wird, wurden Versuche mit Dexamethasongabe (0,5 - 1,0 mg/kg KG) 2-mal wöchentlich subcutan durchgeführt. Hierdurch wurde bei allen Tieren die Sekretion des Corticosterons fast vollständig unterbunden und die Gewichtsentwicklung der Tiere deutlich vermindert.

Bei einem Langzeitberauchungsversuch unter Dexamethason über 8 Wochen mit durchschnittlich 7,3 Zigaretten pro Ratte und Tag konnten wie bei den entsprechenden Versuchen ohne Dexamethason keine wesentlichen Unterschiede in der Aldosteron-Plasmakonzentration und im Körpergewicht zwischen den berauchten Tieren, dem Maschinenkollektiv und dem Käfigkollektiv festgestellt werden. Der Langzeitversuch unter Dexamethason mit subcutaner Gabe von Nikotin entsprach im Aufbau und in der Dosierung dem oben aufgeführten subcutanen Versuch ohne Dexamethason. Während bei den Versuchen mit 2-mal täglich 0,5 mg/kg KG Nikotin in NaCl-Lösung subcutan keine wesentliche Änderung im Aldosteron-Plasmaspiegel auftrat, konnte bei der Gabe von 2-mal täglich 1 mg/kg KG Nikotin in Öl auch in dieser Versuchsreihe ein signifikanter Abfall der Plasmakonzentration des Aldosterons beobachtet werden.

Die Versuche zeigen, daß Nikotin bei entsprechender Dosierung eine Senkung der Aldosteron-Plasmakonzentration verursacht, wobei eine geringe ACTH-Abhängigkeit dieser Reaktion nachweisbar ist. Der Verlauf der Körpergewichtsent-

wicklung spricht gegen eine Hemmung des Aldosterons primär durch eine Nikotin-induzierte NaCl-Volumenreaktion. Aus den bisherigen Befunden ergibt sich kein Anhalt für eine Aktivierung der NaCl-retinierenden endokrinologischen Systeme durch Nikotin.

8. LITERATURANGABEN

Abraham, G.E.:

Solid-phase radioimmunoassay of Estradiol-17 β .

Preliminary Communications.

J. Clin. Endocrin. 29, 866-870 (1969)

Altland, P.D., Rattner, B.A.:

Effects of nicotine and carbon monoxide on tissue and systemic changes in rats.

Environmental Research 19, 202-212 (1979)

Appelgren, L.E., Hansson, E., Schmitterl  w, C.G.:

The accumulation and metabolism of C¹⁴ labelled nicotine in the brain of mice and cats.

Acta physiol. scand. 56, 249-257 (1962)

Armbruster, H., Vetter, W., Beckerhoff, R., Nussberger, J.,

Vetter, H., Siegenthaler, W.:

Diurnal variations of plasma aldosterone in supine man: relationship to plasma renin activity and plasma cortisol.

Acta Endocrinol. 80, 95-103 (1975)

Armitage, A.K., Dollery, C.T., George, C.F., Houseman, T.H.,

Lewis, P.J., Turner, D.M.:

Absorption and metabolism of nicotine from cigarettes.

Brit. Med. J. 4, 313-316 (1975)

Armitage, A.K., Hall, G.H., Morrison, C.F.:

Pharmacological basis for the tobacco smoking habit.

Nature 217, 331-334 (1968)

Aronow, W.S., Dendinger, J., Rokaw, S.N.:

Heart rate and carbon monoxide level after smoking high, low and non-nicotine cigarettes.

Ann. Intern. Med. 74, 697 (1971)

Balfour, D.J., Khullar, A.K., Longden, A.:

Effects of nicotine on plasma corticosterone and brain amines in stressed and unstressed rats.

Pharmacol. Biochem. Behav. 3, 179-184 (1975a)

Balfour, D.J., Morrison, C.F.:

A possible role for the pituitary-adrenal system in the effects of nicotine on avoidance behaviour.

Pharmacol. Biochem. Behav. 3, 349-354 (1975b)

Baumann, K., M  ller, J.

Effects of hypophysectomy with or without ACTH maintenance therapy on the final steps of aldosterone biosynthesis in the rat.

Acta Endocrinol. 76, 102-116 (1974)

- Beckett, A.H., Gorrod, J.W., Jenner, P.:
The effect of smoking on nicotine metabolism in vivo in man.
J. Pharm. Pharmac. 23, 62S-67S (1971)
- Bender, F., Brisse, B.:
Sympatoadrenale Reaktionen bei Gesunden und Patienten
mit kardiovaskulären Erkrankungen unter Einfluß von Zigarettenrauch.
1. Symposium d. Forschungsrates Rauchen und Gesundheit,
Hamburg 1978
- Bisset, G.W.:
Vasopressin release by nicotine: the site of action.
Br. J. Pharmac. 54, 463-474 (1975)
- Blaine, E.H., Davis, J.O., Witty, R.T.:
Renin release after hemorrhage and after suprarenal aortic
constriction in dogs without sodium delivery to the macula
densa.
Circ. Res. 27, 1081 (1970)
- Blair-West, J.R.:
Renin-angiotensin system and sodium metabolism.
In: Int. Rev. Physiol., Vol. 11 (Hrsg.: Thirau, K.),
Baltimore 1976, 95-143
- Blair-West, J.R., Cain, M.D., Catt, K.J., Coghlan, J.P.,
Denton, D.A., Funder, J.W., Scoggins, B.A., Wright, R.D.:
The dissociation of aldosterone secretion and systemic
renin and angiotensin II levels during the correction of
sodium deficiency.
Acta Endocrinol. 66-229 (1971)
- Blair-West, J.R., Coghlan, J.P., Denton, D.A., Goding, J.R.,
Wintour, M., Wright, R.D.:
The action of electrolyte changes and some naturally-occurring
pharmacological substances on the adrenal cortex.
In: Hormones and Kidney (Hrsg.: Williams, P.C.),
London 1963, 341
- Bourne, A.R.:
A convenient system for the separation of some steroids
on Sephadex LH-20.
J. Chromatogr. 92, 465-466 (1974)
- Brown, J.J., Davies, D.L., Lever, A.F., Robertson, J.I.S.,
Peart, W.S.:
The estimation of renin in plasma.
In: Aldosterone (Hrsg.: Baulieu, E.E. und Robel, P.),
Blackwell Scientific Publications, Oxford 1964, 417

- Burn, J.H., Truelove, L.H., Burn, J.:
The antidiuretic action of nicotine and smoking.
Brit. Med. J. 1, 403-406 (1945)
- Cadnapaphornchai, P., Boykin, J.L., Berl, T., McDonald, K.M.,
Schrier, R.W.:
Mechanism of effect of nicotine on renal water excretion.
Am. J. Physiol. 227, 1216-1220 (1974)
- Campbell, W.B., Brooks, S.N., Pettinger, W.A.:
Angiotensin II- and angiotensin III-induced aldosterone
release in vivo in the rat.
Science 184, 994-996 (1974)
- Castro, A., Bartos, D., Jelen, B., Kutas, M.:
A radioimmunoassay for deoxycorticosterone in human peripheral
plasma using sephadex LH-20 chromatography.
Steroids 22, 851-867 (1973)
- Castro, A., Kutas, M., Jelen, B., Bartos, D.:
A simultaneous measurement of plasma aldosterone and
deoxycorticosterone by radioimmunoassay.
J. Steroid Biochem. 5, 21-26 (1974)
- Castro de Souza, E., Rocha e Silva, M. jr.:
The release of vasopressin by nicotine: further studies on
its site of action.
J. Physiol. (Lond.) 265, 297-311 (1977)
- Cates, J.E., Garrod, O.:
The effect of nicotine on urinary flow in diabetes insipidus.
Clin. Science 10, 145-159 (1951)
- Cellina, G.H., Honour, A.J., Littler, W.A.:
Direct arterial pressure, heart rate and electrocardiogram
during cigarette smoking in unrestricted patients.
Am. Heart J. 89, 18-25 (1975)
- Connolly, C.K., Gore, M.B.R., Stanley, N., Wills, M.R.:
Single-dose dexamethasone suppression in normal subjects
and hospital patients.
Brit. Med. J. 2, 665-667 (1968)
- Conte-Devolx, B., Rougon-Rapuzzi, G., Millet, Y.:
Dosage plasmatique radioimmunologique de la vasopressine:
Réponse à la stimulation par la nicotine.
Radioimmunoassay for vasopressin: plasma levels after
stimulation by i.v. nicotine injection.
Ann. Endocrinol. (Paris) 37, 291-2 (1976)

- Conte-Devolx, B., Rougon-Rapuzzi, G., Millet, Y.:
Dosages plasmatiques radioimmunologiques de la 8-arginine
vasopressine, réponse a la stimulation par la nicotine.
Radioimmunoassay for human plasma 8-arginine-vaso-
pressin.
Ann. Endocrinol. (Paris) 38, 61-72 (1977)
- Copinschi, G., Lhérmite, ., Leclercq, R., Goldstein, J.,
Vanhaelst, L., Virasoro, E., Robyn, C.:
Effects of glucocorticoids on pituitary hormonal responses
to hypoglycemia. Inhibition of prolactin release.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 40, 3 - 442 (1975)
- Corcoran, A.C., Hemler, O.M., Page, J.H.:
The determination of nicotine in urine.
J. Biol. Chem. 129, 98 (1939)
- Cryer, P.E., Haymond, M.W., Santiago, J.V., Shah, S.D.:
Norepinephrine and epinephrine release and adrenergic
mediation of smoking-associated hemodynamic and metabolic
events.
Engl. J. Med., 295, 573-577 (1976)
- Daniel, J.Y., Mion, H., Soulas, D.:
Radioimmunoassay of plasma aldosterone by chromatography
on sephadex LH-20.
Clin. Chim. Acta 55, 235-243 (1974)
- Davis, J.O., Urquhart, J., Higgins, J.T.:
The effects of alteration of plasma sodium and potassium
concentration on aldosterone secretion.
J. Clin. Invest. 42, 597 (1963)
- Dixon, W.J.:
BMDP-77, Biomedical Computer Programs, P-Series (Program
BMDP 2V).
Berkley 1977
- Dontenwill, W.:
Experimental investigations on the effect of cigarette
smoke inhalations on small laboratory animals.
In: Inhalation Carcinogenesis (Hrsg.: Hanna, M., Nettesheim,
P., Gilbert, J.R.) Oak Ridge 1970
- Dontenwill, W., Reckzeh, G., Stadler, L.:
Berauchungsapparatur für Laboratoriumstiere.
Beiträge zur Tabakforschung 4, 45-49 (1967)
- Dorfman, G., Ungar, H.:
Metabolism of steroid hormones.
Acad. Press, New York 1965

Doyle, J.T.:

Cigarette smoking and coronary atherosclerosis.
In: Atherosclerosis and Coronary Heart Disease (Hrsg.:
Likoff, W., Segal, B., Insull, N.), Grune and Stratton,
New York 1972

Emele, J.F.:

Pharmacology of nicotine.
In: Smoking and Health II. Health Consequences Education,
Cessation Activities, and Governmental Action (Hrsg.:
Steinfeld, J. u.a.), New York 1975

Engelhardt, G.:

Untersuchungen über die Wirkungsstärke des Pyridin-4-carbon-
säure (dexamethason-21')esters im Tierexperiment.
Arzneimittelforschung 13, 588-597 (1963)

Espiner, E.A., Lun, S., Hart, D.S.:

Role of ACTH, angiotensin and potassium in stress-induced
aldosterone secretion.
J. Steroid Biochem. 9, 109-113 (1978)

Fekete, Gy., Szeberenyi, Sz.:

Adrenal suppression caused by some new synthetic gluco-
corticoids.
Arzneimittelforschung 18, 4, 451-452 (1968)

Feldberg, W., Guertzenstein, P.G., Rocha, E., Silva, M. jr.:

Vasopressin release by nicotine: the site of action.
Br. J. Pharmacol. 54, 463-474 (1975)

Feldman, S., Conforti, N., Chowers, I.:

Effect of dexamethasone on adrenocortical responses in intact
and hypothalamic deafferented rats.
Acta Endocrinol. 73, 660-664 (1973)

Fuller, R.W., Snoddy, H.D.:

Elevation of plasma corticosterone by swim stress and
insulin-induced hypoglycemia in control and fluoxetine-
pretreated rats.
Endocrine Res. Comm. 4, 11-23 (1977)

Ganguly, A., Chavarri, M., Luetscher, J.A., Dowdy, A.J.:

Transient fall and subsequent return of high aldosterone
secretion by adrenal adenoma during continued dexamethasone
administration,
J. C. E. + M. 44, 775-779 (1977)

Ganong, W.F.:

Medizinische Physiologie.
Springer-Verlag, Berlin 1971

- Goldbourt, U., Medalie, J.H.:
Characteristics of smokers, non-smokers and ex-smokers among
10000 adult males in Israel.
Amer. J. Epidemiol. 105, 77 (1977)
- Golder, W.A., Sippel, W.G.:
Sephadex LH-20 multiple-column chromatography for the
simultaneous separation of progesterone, deoxycorticosterone
and 17-alpha hydroxyprogesterone from small plasma samples.
J. Chromatogr. 123, 293-299 (1976)
- Gordon, T., Kannel, W.B., Dawler, T.R., McGree, D.:
Changes associated with quitting smoking: the Framingham
study.
Am. Heart J. 90, 322-328 (1975)
- Greene, S.B., Asvedal, M.J., Tyroler, H.A., Davis, C.E.,
Hames, C.G.:
Smoking habits and blood pressure change: a seven year
follow up.
J. Chron. Dis. 30, 401-413 (1977)
- Guha, D., Williams, E.F., Nimitkitpaisan, Y., Bose, S.,
Dutta, S.N., Pradhan, S.N.:
Effects of sound stimulus on gastric secretion and plasma
corticosterone level in rats.
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 13, 273-281 (1976)
- Haack, D., Engel, R., Vecsei, P.:
The effect of chronic ACTH treatment on blood pressure and
urinary excretion of steroids in the rat.
Klin. Wochenschr. 56, Suppl. 1, 183-186 (1978)
- Haag, H.B., Larson, P.S.:
Studies on the fate of nicotine in the body. I. The effect
of pH on the urinary excretion of nicotine by tobacco
smokers.
J. Pharmacol. exp. Ther. 76, 235-239 (1942)
- Hall, G.H., Morrison, C.F.:
New evidence for a relationship between tobacco smoking,
nicotine dependence and stress.
Nature 243, 199-201 (1973)
- Harper, H.A., Löffler, G., Petrides, P.E., Weiss, L.:
Physiologische Chemie.
Springer-Verlag, Berlin 1975
- Hayward, J.N., Pavasuthipaisit, K.:
Vasopressin released by nicotine in the monkey.
Neuroendocrinology 21, 120-129 (1976)

- Heath, C.W.:
Differences between smokers and non-smokers.
A.M.A. Archives of internal Medicine 101, 377-388 (1958)
- Heyden-Stucky, S.:
Probleme des Herzinfirmen.
Schweizer. Med. Wochenschr. 45, 1536-1540 (1965)
- Heymans, C., Bouckaert, J.J., Dautrebande, I.:
Sinus carotidien et réflexes respiratoires. III. Sensibilité des sinus carotidiens aux substances chimiques. Action stimulante respiratoire réflexe du sulfure de sodium, du cyanure de potassium, de la nicotine et de la lobéline.
Archs. int. Pharmacodyn. Thér. 40, 54-91 (1931)
- Hilfenhaus, M.:
Effect of furosemide, propranolol, and dexamethasone on plasma aldosterone levels in rats.
Arch. Pharmacol. Suppl. 282, R 32 (1974)
- Hilfenhaus, M.:
Circadian rhythm of the renin-angiotensin-aldosterone system in the rat.
Arch. Toxicol. 36, 305-316 (1976)
- Hilfenhaus, M.:
Evaluation of radioimmunoassay for aldosterone in urine and plasma of rats.
J. Steroid Biochem. 8, 847-851 (1977a)
- Hilfenhaus, M.:
Urinary aldosterone excretion rate and plasma aldosterone concentration in the rat: effect of ACTH, DOC, furosemide and of changes in sodium balance.
Acta Endocrinol. 85, 134-142 (1977b)
- Hill, P., Wynder, E.L.:
Smoking and cardiovascular disease. Effect of nicotine on the serum epinephrine and corticoids.
Am. Heart J. 87, 491-496 (1974)
- Hodges, J.R., Jones, M.T.:
The effect of inject corticosterone on the release of adrenocorticotrophic hormone in rats exposed to acute stress.
J. Physiol. 167, 30-37 (1963)
- Hökfelt, B.:
The effect of smoking on the production of adreno-cortical hormones.
Acta Med. Scand. 369, 123-124 (1961)

Holzbauer, M.:

The part played by ACTH in determining the rate of aldosterone secretion during operative stress.

J. Physiol. (Lond.) 172, 138 (1964)

Husain, M.K., Frantz, A.G., Ciarochi, F., Robinson, A.G.:

Nicotine-stimulated release of neurophysin and vasopressin in humans.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 41, 1113-1117 (1975)

Ischikawa, S., Murata, K., Shigiya, R.:

Application of a marker dye on sephadex LH-20 column chromatography in radioimmuno-assay of plasma aldosterone.

Endocrinol. JPN 21, 361-365 (1974)

Imbert-Teboul, M., Chabardes, D., Montegut, M., Clique, A., Morel, F.:

Impaired response to vasopressin in adenylate cyclase of the thick ascending limb of Henle's loop in Brattleboro rats with Diabetes insipidus.

Renal Physiol. 1, 3-10 (1978)

Jones, R.A., Strickland, A., Stunkard, A., Siegel, J.:

Effects of experimental animals of long-term inhalation exposure to carbon monoxide.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 19, 46-53 (1971)

Kendall, J.W.:

Studies on inhibition of corticotropin and thyrotropin release utilizing microinjection into the pituitary.

Endocrinol. 71, 452-455 (1962)

Kendall, J.W., Matsuda, K., Duyck, C., Greer, M.A.:

Studies on the location of the receptor site for negative feedback control of ACTH release.

Endocrinol. 74, 279-283 (1964)

Kenyon, C.J., Hargreaves, G., Henderson, I.W.:

Adrenocortical function in rats with inherited hypothalamic Diabetes insipidus (Brattleboro strain).

J. Steroid Biochem. 9, 345-348 (1978)

Kershbaum, A., Pappajohn, D.J., Bellet, S., Hirabayashi, M., Shafiiha, H.:

Corticosteroid response to nicotine.

JAMA 200, 45 (1967a)

Kershbaum, A., Pappajohn, D.J., Bellet, S., Hirabayashi, M., Shafiiha, H.:

The effect of smoking and nicotine on the adrenal cortex.

JAMA 200, 538-539 (1967b)

Kershbaum, A.:

Effect of cigarette, cigar, and pipe smoking on nicotine excretion: the influence of inhaling.

Arch. Intern. Med. 120, 311-314 (1967c)

Kershbaum, A., Pappajohn, D.J., Bellet, S., Hirabayashi, M., Shaffliha, H.:

Effect of smoking and nicotine on adrenocortical secretion. JAMA 303, 275-278 (1968)

Keys, A., Taylor, H.L., Blackburn, H., Brozek, J., Anderson, J.T., Simonson, E.:

Mortality and coronary heart disease among men studied for twenty-eight years.

Arch. Intern. Med. 128, 201 (1971)

Kuschinsky, W., Wahl, M.:

Endokrinologie.

In: Vegetative Physiologie, Bd. 2 (Hrsg.: Kramer, K.), Verlag Urban & Schwarzenberg, München 1980

Laragh, J.H., Sealey, J.E.:

The renin-angiotensin-aldosterone hormonal system and regulation of sodium, potassium, and blood pressure homeostasis.

In: Handbook of Physiology. Section 8: Renal Physiology (Hrsg.: Orloff, J., Berliner, R.W.), American Physiological Society, Washington D.C. 1973, 831-908

Lautenbach, B.F.:

On the difference in the effects produced by nicotine when injected into an efferent from these produced by the introduction of the poison into an afferent bloodvessel.

Phelad. Med. Tms. 10, 523 (1879/80)

Legros, J.J., Conte-Devolx, B., Rougan-Rapuzzi, G., Millet, Y., Franchimont, P.:

Libération simultanée de vasopressine (A.D.H.) et de neurophyssines lors de la perfusion de nicotine chez l'homme.

Comptes rendus des seances de la Société de Biologie. Extrait du Tome 171, 478-483 (1977)

Lickint, F.H., Lukesch, H.:

Ein Beitrag zur Ermittlung der Nicotinausscheidung in dem Harn nach Tabakgenuß.

Pharmazie 11, 39 (1956)

Malvin, R.L., Fusco, M.M.:

Renal function in unanesthetized normal and diabetes insipidus rats.

J. Appl. Physiol. 22, 380-382 (1967)

- Marshall, M.:
Atherogenese.
Münch. med. Wochenschr. 121, 1211-1218 (1979)
- Marshall, M., Hess, H., Staubesand, J.:
Kohlenmonoxid wichtig für die Angiopathieentstehung durch
Zigarettenrauchen.
Experiment. Untersuch. über den Risikofaktor Rauchen,
Vasa Band 7, 389-397 (1978)
- Martini, L., Giuliani, G., Motta, M.:
A method of evaluating corticotropin-inhibiting steroids.
Acta Endocrinol. 52, 497-503 (1966)
- Mattingly, D.:
A simple fluorimetric method for the estimation of free
11-hydroxycorticosteroids in human plasma.
J. Clin. Pathol. 15, 374-379 (1962)
- McKennis, H. jr.:
Disposition and fate of nicotine in animals.
In: Tobacco Alkaloids and Related Compounds (Hrsg.: von Euler,
U.S.), Pergamon Press, Oxford 1965
- Möhring, J., Dauda, G., Haack, D., Hofbauer, K.G., Homsy, E.,
Naumann, H.J., Orth, H., Gross, F.:
Malignant phase of renal hypertension in rats.
Eur. J. Clin. Invest. 2, 297 (1972)
- Möhring, B., Möhring J., Dauda, G., Haack, D.:
Potassium deficiency in rats with hereditary diabetes
insipidus.
Am. J. Physiol. 227, 916-920 (1974)
- Müller, O.A., Fink, R., Baur, X., Ehbauer, M., Madler, M.,
Scriba, P.C.:
ACTH im Plasma: Extraktion und Bestimmung.
Labor-Medizin 2, 117-124 (1978)
- Mulrow, P.J., Lytton, B., Stansel, H.C.:
The role of the renin-angiotensin system in the hypertension
associated with renal vascular disease.
Proceedings of International Club of Arterial Hypertension,
Vol. I, S. 296 (1966)
- Murphy, B.E.P.:
Sephadex column chromatography as an adjunct to competitive
protein binding assays of steroids.
Nature New Biol. 232, 21-23 (1971)

- Nowaczynski, W. Sasaki, C., Genest, J.:
Radioimmunoassay for aldosterone and normal values under
various physiological conditions.
J. Steroid Biochemistry 5, 123-131 (1974)
- Pfeiffer, E.F., Vaubel, W.E. Retiene, K., Berg, D., Ditschuneit,
H.:
ACTH-Bestimmung mittels Messung des Plasma-Corticosterons
der mit Dexamethason hypophysenblockierten Ratte.
Klin. Wschr. 38, 19, 980-983 (1960)
- Ramaley, J.A.:
The development of daily change in serum corticosterone in
pre-weanling rats.
Steroids 21, 433-442 (1973)
- Reid, D.D., Holland, W.W., Rose, G.A.:
An Anglo-American cardiovascular comparison.
The Lancet, 30, Dez. 1967, 1375-1378
- Reid, J.A., Ganong, W.F.:
The hormonal control of sodium excretion.
International Review of Science Physiology Vol. 5 (Hrsg.:
McCann, S.M.), London 1974, 205-237
- Riley, V.:
Adaption of orbital bleeding technique to rapid serial
blood studies.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 104, 751-754 (1960)
- Rubin, R.P., Warner, W.:
Nicotine-induced stimulation of steroidogenesis in adreno-
cortical cells of the cat.
Br. J. Pharmacol. 53, 357-362 (1975)
- Sawyer, W.H., Vaitin, H.:
Antidiuretic responses of rats with hereditary hypothalamic
Diabetes insipidus to vasopressin, oxytocin and nicotine.
Endocrinol. 80, 207-210 (1967)
- Silber, R.H., Porter, C.C.:
The determination of 17,21-dihydroxy-20-ketosteroids in
urine and plasma.
J. biol. Chem. 210, 923-932 (1954)
- Sippell, W.G., Bidlingmaier, H., Becker, T., Brüning, H.,
Dörr, H., Hahn, H., Golder, W.:
Simultaneous radioimmunoassay of plasma aldosterone, corti-
costerone, 11-deoxycorticosterone, progesterone, 17-hydroxy-
progesterone, 11-deoxycortisol, cortisol and cortisone.
J. Steroid Biochem. 9, 63-74 (1978)

- Sippell, G., Lehmann, P., Hollmann, G.:
Automation of multiple sephadex LH-20 column chromatography
for the simultaneous separation of plasma corticosteroids.
J. Chromatogr. 108, 305-312 (1975)
- Sirett, N.E., Gibbs, F.P.:
Dexamethasone suppression of ACTH release: effect of the
interval between steroid administration and the application
of stimuli known to release ACTH.
Endocrinol. 85, 355-359 (1969)
- Skinner, S.L., McCubbin, J.W., Page, I.H.:
Control of renin secretion.
Circ. Res. 15, 64 (1964)
- Spohr, U.:
Akute Stoffwechselveränderung während und unmittelbar nach
dem Zigarettenrauchen bei gesunden Versuchspersonen.
2. Symposium des Forschungsrates Rauchen und Gesundheit,
Celle 1979
- Suzuki, T., Ikeda, H., Narita, S., Shibata, O., Waki, S.,
Egashira, K.:
Adrenal cortical secretion in response to nicotine in
conscious and anaesthetized dogs.
Quart. J. Exp. Physiol. 58, 139-142 (1973)
- Schievelbein, H.:
Nikotin Pharmakologie und Toxikologie des Tabakrauchens.
Georg Thieme-Verlag, Stuttgart 1968
- Schievelbein, H.:
The evidence for nicotine as an etiological factor in
cardiovascular disease.
In: Modifying the Risk for the Smoker, 1 (Hrsg.: Wynder, E.L.,
Hoffmann, D., Gori, G.B.), DHEW Publikation No(NIH)
297-307 (1976)
- Schievelbein, H., Eberhardt, R.:
Cardiovascular actions of nicotine and smoking.
J. Nat. Cancer Inst. 481, 1785-1794 (1972)
- Schmitterlów, C.G., Hansson, E.:
Tissue distribution of C¹⁴-nicotine.
In: Tobacco Alkaloids and Related Compounds (Hrsg.: von Euler,
U.S.), Pergamon Press, Oxford 1965

- Stamler, J., Stamler, R., Shekelle, R.B.:
Regional differences in prevalence, incidence and mortality
from atherosclerotic coronary heart disease.
In: Ischaemic Heart Disease (Hrsg.: de Hass, J.H., Hemker,
H.C., Snellen, H.A.), University Press, Leiden 1970, 84
- Thurau, K., Schnermann, J.:
Die Natriumkonzentration an den Macula densa-Zellen als re-
gulierender Faktor für das Glomerulumfiltrat.
Klin. Wschr. 43, 410 (1965)
- Thurau, K., Schnermann, J., Nagel, W., Horster, M., Wahl, M.:
Composition of tubular fluid in the macula densa segment
as a factor regulating the function of the juxtaglomerular
apparatus.
Circ. Res. 79, 20-21 (1967)
- Tucci, J.R., Sode, J.:
Chronic cigarette smoking. Effect on adrenocortical and
sympatho-adrenomedullary activity in man.
JAMA 221, 282-285 (1972)
- Turner, D.M.:
The role of adrenal catecholamines in the release of corti-
costerone and fatty acids by nicotine in the rat.
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 12, 645-655 (1975)
- Valtin, H., Schroeder, H.A.:
Familiar hypothalamic diabetes insipidus in rats (Brattleboro
strain).
Am. J. Physiol. 206, 425-430 (1964)
- Vander, A.J.:
Control of renin secretion.
Physiol. Rev. 47, 359 (1967)
- Vescei, P., Gless, K.H.:
Aldosteron-Radioimmunoassay, Ferdinand Enke-Verlag,
Stuttgart 1975
- Veyrat, R., de Champlain, J., Boucher, R., Genest, J.:
Measurement of human arterial renin activity in some phyio-
logical and pathological states.
Can. Med. Assoc. J. 90, 215 (1964)
- Vinson, G.P., Goddard, C., Whitehouse, B.J.:
Coricosteroid production in vitro by adrenal tissue from
rats with inherited hypothalamic diabetes insipidus
(Brattleboro strain).
J. Steroid Biochem. 9, 657-665 (1978)

- Volle, R.L., Koelle, G.B.:
Ganglionic stimulating and blocking agents.
In: The pharmacological basis of therapeutics (Hrsg.: Goodman,
L.S., Gilman, A.), Macmillan Publ., New York 1975
- Weeks, J.R.:
Cardiovascular techniques using unanesthetized and freely
moving rats.
Experimental Biology Division, The Upjohn Company, Kalamazoo,
Michigan/USA 1978
- Wenzel, D.G., Azmeh, N.:
Chronically administered nicotine and the blood pressure of
normotensive and renal hypertensive rats.
Arch. int. Pharmacodyn. 187, 367-376 (1970)
- Wenzel, D.G., Azmeh, N., Clark, I.J.:
Studies on the acute and chronic depressor actions of
nicotine in the rat.
Arch. int. Pharmacodyn. 193, 23-36 (1971)
- deWied, D.:
The blocking action of dexamethasone on pituitary ACTH
release.
Acta Endocrinol. 67, 75 (1962)
- Williams, G.H., Cain, J.P., Dluhy, R.G., Underwood, R.H.:
Studies of the control of plasma aldosterone concentration
in normal man.
J. Clin. Invest. 51, 1731-1742 (1972)
- Winternitz, W.W., Quillen, D.:
Acute hormonal response to cigarette smoking.
J. Clin. Pharmacol. 17, 389-397 (1977)
- Wynder, E.L., Hoffmann, F.:
The less harmful cigarette: cancerogenesis.
1. Symposium des Forschungsrates Rauchen und Gesundheit,
Hamburg 1978
- Wynder, E.L.:
Lungen- und Blasenkarzinome und ihre Beziehung zum Zigaret-
tenrauchen - eine epidemiologische Untersuchung.
2. Symposium des Forschungsrates Rauchen und Gesundheit,
Celle 1979

9. ANHANG

Kurzzeitversuche mit Berauchung

Corticosteron [ng/ml] Aldosteron [pg/ml] Gewichtsverlust [g/30 h]

Tier Nr.	Maschine	Rauch	Maschine	Rauch	Maschine	Rauch
1	220	320	900	440	8 %	13 %
2	280	580	750	500	9 %	14 %
3	350	450	940	450	10 %	13 %
4	240	620	1090	500	12 %	16 %
5	280	550	730	600	4 %	16 %
6	270	410	920	450	7 %	15 %
7	190	680	1020	800	5 %	10 %
8	200	380	600	330	4 %	15 %
9	260	560	1130	790	1 %	11 %
10	270	460	760	400	4 %	7 %
11	250	520	820	570	3 %	10 %
12	190	370	720	740	8 %	14 %
$\bar{x}$	248	505	865	548	6 %	13 %
SD	49	122	151	148	3 %	3 %

Langzeitversuche mit Berauchung

Tier Nr.	Corticosteron [ng/ml]				Aldosteron [pg/ml]				Gewicht [g]			
	Käfig	Maschine	Rauch		Käfig	Maschine	Rauch		: Käfig	Maschine	Rauch	
1	260	160	90		510	320	390		460	435	335	
2	140	200	140		440	420	420		395	375	405	
3	140	130	170		420	290	270		390	405	380	
4	-	180	150		-	480	400		-	395	420	
5	190	230	230		540	360	410		430	375	410	
6	150	130	240		450	390	470		365	400	400	
7	100	70	200		480	300	410		440	380	380	
8	230	130	170		580	340	440		370	415	365	
9	120	200	-		330	360	-		390	365	405	
10	160	40	90		460	280	360		400	370	410	
11	150	160	240		230	370	490		380	405	380	
12	200	190	90		340	570	270		420	410	385	
$\bar{x}$	167	152	165		435	373	395		404	394	390	
SD	48	57	59		101	84	72		30	21	24	

1
2
1

Langzeitversuche mit s.c. Nikotingabe in NaCl-Lösung

Tier Nr.	Kontrolle	Nikotin	Kontrolle	Aldosteron [pg/ml]	Kontrolle	Nikotin	Gewicht [g]
1	240	230	450		200	405	400
2	160	200	460		490	440	445
3	330	210	530		650	395	425
4	120	230	360		370	430	415
5	240	170	450		420	425	410
6	180	230	370		390	430	395
7	200	120	940		290	435	395
8	180	120	480		410	450	410
9	140	190	200		440	415	420
10	230	100	590		260	475	450
11	190	190	370		320	420	400
12	190	190	-		350	440	390
$\bar{x}$	200	182	473		383	430	413
SD	55	45	186		117	21	19

Langzeitversuche mit s.c. Nikotingabe in Öl

Tier Nr.	Corticosteron [ng/ml]		Aldosteron [pg/ml]		Gewicht [g]	
	Kontrolle	Nikotin	Kontrolle	Nikotin	Kontrolle	Nikotin
1	120	300	410	160	455	375
2	160	150	530	160	465	390
3	120	220	550	380	430	400
4	190	80	600	200	460	425
5	370	80	590	140	470	400
6	220	130	370	170	460	385
7	210	160	440	230	385	355
8	-	270	-	360	420	430
9	90	140	330	200	435	420
10	170	150	290	370	430	415
11	-	170	-	410	445	415
12	140	140	310	260	425	435
$\bar{x}$	179	166	442	253	440	404
SD	79	67	118	100	24	24

Langzeitversuche mit Berauchung unter Dexamethason

Tier Nr.	Corticosteron [ng/ml]		Aldosteron [pg/ml]		Gewicht [g]		
	Käfig	Maschine	Rauch	Käfig	Maschine	Rauch	
1				330	330	340	300
2				340	290	310	280
3				320	390	300	280
4				390	350	400	280
5				330	300	280	280
6				430	270	280	280
7	stets kleiner 5 ng/ml			330	360	330	305
8				340	470	360	290
9				310	310	370	250
10				470	440	340	280
11				260	250	370	290
12				310	290	230	260
$\bar{x}$				347	338	326	281
SD				57	68	48	15

Langzeitversuche mit s.c. Nikotingaben in NaCl-Lösung unter Dexamethason

Tier Nr.	Corticosteron [ng/ml]		Aldosteron [pg/ml]		Gewicht [g]	
	Kontrolle	Nikotin	Kontrolle	Nikotin	Kontrolle	Nikotin
1			310	290	310	275
2			330	300	300	295
3			440	320	270	300
4			430	340	300	290
5			360	300	300	275
6			260	410	270	290
7		stets kleiner 5 ng/ml	370	380	315	290
8			220	400	285	300
9			330	370	285	285
10			360	330	250	290
11			280	350	280	300
12			400	290	280	260
$\bar{x}$			341	340	287	288
SD			67	45	19	12

Langzeitversuche mit s.c. Nikotingabe in Öl unter Dexamethason

Tier Nr.	Corticosteron [ng/ml]		Aldosteron [pg/ml]		Gewicht [g]	
	Kontrolle	Nikotin	Kontrolle	Nikotin	Kontrolle	Nikotin
1			360	290	295	295
2			390	210	335	285
3			280	270	265	290
4			390	280	285	295
5			330	320	330	270
6			360	350	310	260
7			380	360	290	270
8			340	230	335	260
9			300	300	295	275
10			380	180	290	280
11			490	290	295	315
12			330	210	325	315
$\bar{x}$			361	274	304	293
SD			54	60	24	35

stets kleiner 5 ng/ml

Herstellungsform:

Mehl	Preßlinge, Durchmesser in mm			
	3	4.5	10	15

Bestellnummer:

1321	-	1323	1324	-
------	---	------	------	---

Spezial-behandelte Diät

- Lieferung auf Sonderwunsch
- geeignet zum Einsatz in SPF-Bereichen ohne vorherige Behandlung der Diät.
- In Kunststoffsäcken verschweißt, mit Luftpolster zur Kontrolle der Unversehrtheit.

Rohnährstoffe*

Rohprotein	19.0
Rohfett	4.0
Rohfaser	6.0
Asche	7.0
Wasser	13.5
N-freie Extraktst.	50.5

Umsetzbare Energie:

Kcal/kg	3.100
KJ /kg	13.000

Mineralstoffe*

Calcium	0.9
Phosphor	0.7
Magnesium	0.2
Natrium	0.2

Vitamine***

Standard-Diät

Vitamin A	15.000	IE
Vitamin D ₃	600	IE
Vitamin E	75	mg
Vitamin K ₃	3	mg
Vitamin B ₁	18	mg
Vitamin B ₂	12	mg
Vitamin B ₆	9	mg
Vitamin B ₁₂	24	mcg
Nikotinsäure	36	mg
Pantothensäure	21	mg
Folsäure	2	mg
Biotin	60	mcg
Cholin	600	mg
Vitamin C	36	mg

Aminosäuren*

Lysin	0.9
Methionin + Cystin	0.6
Phenylalanin + Tyrosin	1.4
Arginin	1.1
Histidin	0.4
Tryptophan	0.2
Threonin	0.6
Isoleucin	0.9
Leucin	1.3
Valin	0.9

Spurenelemente**

Mangan	75.0
Eisen	135.0
Kupfer	13.0
Zink	70.0
Jod	0.9
Fluor	9.0

Vitamine***

Standard-Diät (fortified) und spezialbehandelte Diät

Vitamin A	25.000	IE
Vitamin D ₃	1.000	IE
Vitamin E	125	mg
Vitamin K ₃	5	mg
Vitamin B ₁	30	mg
Vitamin B ₂	20	mg
Vitamin B ₆	15	mg
Vitamin B ₁₂	40	mcg
Nikotinsäure	60	mg
Pantothensäure	35	mg
Folsäure	3	mg
Biotin	100	mcg
Cholin	1.000	mg
Vitamin C	60	mg

LEBENS LAUF

Als Sohn des Dr.-Ing. Gerd Seifert und seiner Frau Marianne geb. Henckels wurde ich am 16.11.1948 in Burscheid/Köln geboren. Von 1954 bis 1958 besuchte ich die Volksschule in Feldafing/Starnberg und anschließend das Gymnasium Landheim Schondorf/Ammersee. Dort legte ich 1968 die Reifeprüfung ab. Danach studierte ich an der Technischen Universität München Maschinenbau und schloß das Studium 1973 als Diplom-Ingenieur ab. Von 1973 bis 1977 war ich wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Werkstoff- und Verarbeitungswissenschaften der Technischen Universität München. 1976 promovierte ich dort zum Dr.-Ing. über die Entwicklung eines neuen Verfahrens zur Ultraschallanwendung.

Von 1975 bis 1981 studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München Medizin. Seit 1977 bin ich wissenschaftlicher Mitarbeiter am Physiologischen Institut der Universität München.

